

Université de Montréal

**Détermination du rôle du domaine de liaison à la myosine de
l'anilline durant la cytokinèse**

Par Hicham Belhaj

Département de pathologie et biologie cellulaire
Faculté de médecine

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de Maître ès science
en biologie moléculaire
option générale

Août 2021

© Hicham belhaj, 2021

Université de Montréal
Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé :

**Détermination du rôle du domaine de liaison à la myosine de
l'anilline durant la cytokinèse**

Présenté par :
Hicham Belhaj

a été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes :

Vincent Archambault, Président rapporteur

Gilles Hickson, Directeur de recherche

Jean-Francois Côté, Membre du jury

Résumé

Au cours de la cytokinèse, qui se produit à la fin de la division cellulaire, un sillon de clivage se forme au milieu de la cellule et se contracte pour la diviser en deux. Bien que de multiples mécanismes responsables du positionnement des sillons semblent coexister, les modèles actuels suggèrent que l'ingression du sillon est guidée par l'assemblage et la contraction de filaments d'actomyosine qui s'organisent en un anneau contractile (AC), structure très dynamique dans laquelle les filaments sont assemblés et désassemblés en continu. Après sa fermeture, l'anneau contractile se transforme en une structure plus stable appelée l'anneau du midbody (AM) qui orchestre l'abscission. Pour réussir la cytokinèse, les filaments d'actomyosine sont assemblés sur un réseau de protéines cytosquelettiques au niveau du site de clivage qui agissent comme un échafaudage et relient les filaments d'actomyosine à la membrane cellulaire. Une des protéines qui jouent un rôle central dans l'organisation de cet échafaudage est l'anilline. L'anilline contient plusieurs domaines de liaison à différentes protéines, parmi eux, le domaine de liaison à la myosine. Ce dernier fait partie des domaines les moins étudiés de l'anilline et dont le rôle reste inconnu. Notre hypothèse est que ce domaine est nécessaire pour la rétention de l'anilline à l'AM durant sa maturation. Divers mutants du MyoBD ont été fusionnés à une protéine fluorescente et caractérisés par microscopie confocale. Nos résultats suggèrent que, malgré que l'anilline-MyoBD soit facultatif pour la cytokinèse, ce domaine s'avère être important pour la taille des AM produits et pour l'étape d'abscission subséquente.

Mots-clés : Anilline, actine, myosine, anneau du midbody, anneau contractile, rétention, MyoBD, cytokinèse, abscission

Abstract

During cytokinesis, which occurs at the end of cell division, a cleavage furrow forms in the middle of the cell and contracts to divide it in two. Although multiple mechanisms responsible for furrow positioning co-exist, current models suggest that furrow ingression is guided by the assembly and contraction of actomyosin filaments that organize into a contractile ring (CR), a highly dynamic structure in which filaments are continuously assembled and disassembled. After its closure, the CR transforms into a more stable structure called the midbody ring (MR) which orchestrates abscission. To achieve cytokinesis, actomyosin filaments are assembled on a network of cytoskeletal proteins at the cleavage site that act as a scaffold and connect the actomyosin filaments to the cell membrane. One of the proteins that play a central role in the organization of this scaffold is anillin. Anillin contains several protein-binding domains, among them the myosin-binding domain. The latter is one of the least studied domains of Anillin and its role remains unknown. Our hypothesis is that this domain is required for the retention of anillin at the midbody ring during its maturation. Various MyoBD mutants were fused to a fluorescent protein and characterized by confocal microscopy. Our results suggest that, although Anillin-MyoBD is dispensable for cytokinesis, this domain is shown to be important for the size of the MR produced and for the subsequent abscission step.

Keywords : Anillin, actin, myosin, midbody ring, contractile ring, retention, MyoBD, cytokinesis, abscission

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des figures	vii
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements.....	x
1 Introduction	11
1.1 La division cellulaire.....	11
1.1.1 Le cycle cellulaire	11
1.1.2 La mitose et la cytokinèse.....	12
1.1.2.1 La mitose	12
1.1.2.2 La cytokinèse	14
1.1.2.3 Détermination du plan de division	15
- La stimulation du fuseau central.....	15
- La stimulation astrale.....	15
- La relaxation polaire.....	16
- Formation d'une région équatoriale riche en RhoA activée	17
1.1.2.4 La formation de l'anneau contractile	18
1.1.2.5 La constriction de l'anneau contractile	19
1.1.2.6 La formation de l'AM et du midbody	21
1.2 L'abscission	22
1.3 L'anilline dans la cytokinèse	23
2 Projet	30
2.1 Hypothèses et objectifs	30
2.2 Approche expérimentale	30
3 Matériel et méthodes	32
3.1 Biologie moléculaire et constructions	32
3.2 Culture cellulaire et ARNi.....	33
3.3 Microscopie	34
3.4 FRAP.....	34
3.5 Quantification des volumes et intensités des AM	35
3.6 Expression de protéines recombinantes	35
3.7 Essai Pull down	36
3.8 Immunoblot	36
3.9 Immunofluorescence	37
3.10 Logiciels.....	37
4 Résultats.....	38
4.1 Étude du comportement de mutants d'anilline susceptibles de ne plus se lier à la myosine.....	38
4.1.1 L'ARNi contre l'anilline est efficace.....	38
4.1.2 Le MyoBD est facultatif pour une grande partie la cytokinèse.....	40
4.1.3 La troncation du MyoBD provoque des retards/problèmes d'abscission.....	43
4.1.4 Le MyoBD participe à la rétention de l'anilline à l'AM	45

4.2	Étude de l'interdépendance du MyoBD de l'anilline avec la myosine-II	49
4.2.1	Le recrutement du MyoBD au sillon de clivage est dépendant du motif WEDD	49
4.2.2	Le recrutement du MyoBD au sillon de clivage est dépendant de la myosine	51
4.2.3	Les structures LatA comme moyen pour étudier l'interdépendance du MyoBD de l'anilline avec la myosine.....	52
4.2.3.1	Le MyoBD et la myosine-II sont recrutés à des structures LatA différentes dépendamment de la présence ou l'absence de l'anilline endogène.	53
4.2.3.2	Le niveau d'activation de la Myosine affecte le recrutement du MyoBD aux structures LatA non protubérantes	55
4.2.3.3	La colocalisation de l'anilline et de la myosine-II aux structures LatA dépend du MyoBD	57
4.3	Le MyoBD augmente le temps de résidence corticale de la partie N-terminale de l'Anilline, de façon dépendante du NTD adjacent.....	60
4.4	Test de l'interaction MyoBD/Myosine-II	63
5	Discussion.....	66
5.1	Le rôle du MyoBD durant la cytokinèse.....	67
5.1.1	Le MyoBD est facultatif pour la cytokinèse	67
5.1.2	La troncation et la mutation du MyoBD perturbent l'abscission.....	68
5.1.3	Le MyoBD participe à la rétention de l'anilline À l'AM	69
5.2	Une interdépendance entre le MyoBD et la myosine-II durant la cytokinèse	70
5.2.1	Le MyoBD est recruté au sillon de clivage grâce à la myosine-II et au motif WEDD	70
5.2.2	Le MyoBD est recruté aux structures LatA grâce à la myosine-II et au motif WEDD.....	71
5.2.3	L'anilline Δ MyoBD est incapable de recruter la myosine-II aux structures LatA protubérantes	71
5.3	Le NTD joue un rôle inhibiteur du MyoBD au sein de l'anilline.....	72
5.4	Test de l'interaction du MyoBD avec la myosine-II	73
5.5	Modèle.....	75
5.6	Perspectives de recherche.....	76
6	Conclusion	77
7	Références.....	78
8	Annexe	87
8.1	Le MyoBD est facultatif pour une grande partie la cytokinèse	87
8.2	La localisation du MyoBD et du MyoActBDa diffère en interphase	88
8.3	La délétion du MyoBD cause des retards d'abscission.....	89
8.4	Test de l'anticorps Anti-P-MRLC ^{Sqh} in vivo.....	90

Liste des figures

Figure 1: Représentation schématique du cycle cellulaire.	12
Figure 2 : La mitose et la cytokinèse sont des processus qui se superposent dans le temps.	12
Figure 3 : Représentation schématique du modèle de détermination du plan de division reposant sur la stimulation du fuseau central.	15
Figure 4 : Représentation schématique du modèle de détermination du plan de division reposant sur la stimulation astrale.	16
Figure 5 : Représentation schématique du modèle de détermination du plan de division reposant sur la relaxation polaire.	16
Figure 6 : Voie de signalisation Rho-GTP durant la cytokinèse.	18
Figure 7 : Schéma montrant les deux mécanismes par lesquels Rho-GTP active la myosine-II.	19
Figure 8 : représentation schématique des composantes de l'AC et de l'AM.	21
Figure 9 : représentation schématique des protéines impliquées dans le recrutement de Shrub aux régions flanquants le midbody.	22
Figure 10 : représentation schématique des domaines de l'anilline ainsi que de ses interactions avec les effecteurs de Rho-GTP.	23
Figure 11 : l'interaction des septines avec le domaine PH de l'anilline est importante pour le processus de maturation de l'AM.	25
Figure 12 : La déplétion de la citron kinase, Sticky, inhibe la rétention de l'anilline à l'AM.	26
Figure 13 : La troncation du domaine NTD permet une certaine rétention de l'anilline à l'AM.	27
Figure 14 : Le motif WEDD est une séquence très conservée de l'anilline-MyoBD.	29
Figure 15 : L'ARNi contre l'anilline augmente considérablement le taux d'échec de la cytokinèse.	38
Figure 16 : Les mutants anilline- Δ MyoBD et anilline-WEDD sauvent en grande partie la cytokinèse.	40
Figure 17 : La perte de fonction du MyoBD provoque des retards d'abscission.	43
Figure 18 : L'anilline Δ MyoBD produit des AM moins volumineux que l'anilline FL.	45
Figure 19 : L'anilline Δ MyoBD est moins bien retenue à l'AM que l'anilline FL.	47
Figure 20 : Le MyoBD est recruté de manière transitoire au sillon de clivage mais pas le mutant WEDD.	49
Figure 21 : Le recrutement du MyoBD au sillon de clivage suit le statut de l'activation de la myosine II	51
Figure 22 : Structures LatA formées par l'anilline.	52
Figure 23 : Le MyoBD « suit » la myosine-II (MRLC ^{Sqh}) de façon dépendante du motif WEDD.	53
Figure 24 : Les niveaux d'activation de la myosine-II affectent le recrutement du MyoBD aux structures LatA non protubérantes.	55

Figure 25 : MRLC ^{Sqh} est recrutée aux structures LatA protubérantes grâce au MyoBD de l'anilline.....	57
Figure 26 : Le recrutement du MyoBD à la membrane équatoriale est empêché par la surexpression de l'anilline, mais pas par la surexpression de l'anilline-ΔMyoBD.....	59
Figure 27 : Le NTD inhibe la rétention de l'anilline dépendante du MyoBD au cortex....	61
Figure 28 : Le recrutement du MyoBD au sillon de clivage est inhibé par la présence du NTD.....	62
Figure 29 : le MyoBD n'a pas réussi à extraire MRLC ^{Sqh} du lysat cellulaire.....	63
Figure 30 : Modèle montrant l'état de repliement hypothétique de l'anilline N-terminale durant la cytokinèse.....	75
Figure 31 : Les mutants anilline-ΔMyoBD et anilline-WEDD sauvent en grande partie la cytokinèse.....	87
Figure 32 : Le MyoBD est complètement diffus dans le cytoplasme alors que le MyoActBDa est partiellement nucléaire.....	88
Figure 33 : L'abscission ne survient qu'au début de la prochaine division cellulaire chez certaines cellules exprimant l'anilline-ΔMyoBD.....	89
Figure 34 : L'anticorps Anti-P-MRLC ^{Sqh} détecte la P-myosine-II.....	90

Liste des abréviations

NTD : N-terminal domain

MyoBD : Myosin Binding Domain

ActBD : Actin Binding domain

CD : Central Domain

AC : Anneau Contractile

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AM : Anneau du Midbody

APC : Anaphase Promoting Complex

ARNdb : Acide Ribonucléique double brin

ARNi : Acide Ribonucléique interférant

ATP : Adenosine Triphosphate

ESCRT : Endosomal Sorting Complex Required for Transport

GAP : GTPase Activating Protein

GEF : GTPase Exchange Factor

GTP : Guanosine Triphosphate

LatA : Latrunculine A

MKLP : Mitotic Kinesin Like Protein

MRLC : Myosin Regulatory Light Chain

PH : Pleckstrin Homology

Dm : *Drosophila melanogaster*

Hs : *Homo sapiens*

GFP : protéine verte fluorescente (*green fluorescent protein*)

CuSO₄ : Sulfate de cuivre

S2 : Schneider 2

Remerciements

Avant tout, je tiens à remercier mon directeur de recherche, Gilles Hickson pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je lui suis particulièrement reconnaissant de m'avoir enseigné l'essence de la pensée critique, l'intégrité scientifique et pour toutes les discussions perspicaces qui ont amélioré mon expérience scientifique. Il m'a donné la liberté d'explorer par moi-même, tout en étant une source constructive d'encouragement, de soutien et de compréhension tout au long de ma maîtrise.

De plus, je dois un profond remerciement à Amel Kechad, qui, en plus de me guider patiemment dans mon projet avant de quitter le laboratoire Hickson, m'a apporté une aide indispensable. Elle m'a enseigné tout ce dont avait besoin un nouvel étudiant en recherche pour s'approprier son projet.

J'aimerais aussi et bien évidemment remercier Sabrya Carim, la personne qui m'a tout appris en biochimie et bien plus. Nos innombrables discussions sur mon projet, les problèmes rencontrés lors d'expériences, l'actualité et tant d'autres sujets m'ont été très constructives.

Un grand remerciement à tous les membres du laboratoire Hickson que j'ai pu rencontrer lors de ma maîtrise et avec qui on a passé des bons moments.

Enfin, je voudrais dédier cette thèse à mes parents sans lesquels je ne serais pas là, et à la femme de ma vie qui m'a soutenu dans une période très délicate.

1 Introduction

1.1 La division cellulaire

La division cellulaire est un processus fondamental de la vie. Au cours de cette dernière, une cellule duplique tout son contenu, y compris ses chromosomes, et se divise pour former deux cellules filles identiques. Parce que ce processus est si critique, les étapes de la division cellulaire sont soigneusement contrôlées par certains gènes. Lorsque cette dernière n'est pas régulée correctement, des problèmes de santé tels que le cancer peuvent en résulter (Foster, 2008).

1.1.1 Le cycle cellulaire

Le Cycle cellulaire est la séquence ordonnée d'événements qui se produisent dans une cellule en vue de la division cellulaire. Le cycle cellulaire est un processus en quatre étapes dans lequel la cellule augmente en taille (gap 1, ou phase G1), copie son ADN (synthèse, ou phase S), se prépare à se diviser (phase G2), et se divise (mitose, ou phase M) (Figure 1). Les étapes G1, S et G2 constituent l'interphase, qui représente l'intervalle entre les divisions cellulaires. Sur la base des messages de stimulation et d'inhibition qu'une cellule reçoit, elle « décide » si elle doit entrer dans le cycle cellulaire et se diviser (Baserga, 1965; Johnson & Walker, 1999). Le cycle cellulaire est régulé par des kinases mitotiques ainsi que des cyclines spécifiques pour chaque phase.

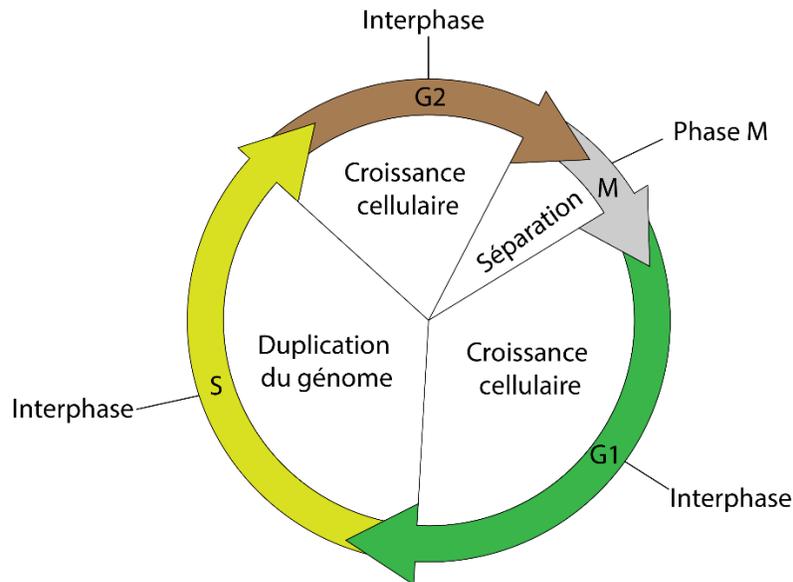


Figure 1: Représentation schématique du cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire se compose de quatre phases distinctes chez les eucaryotes : G1, S, G2 et M. Les phases G1, S et G2 (interphase) sont des phases de croissance et de duplication du génome préparent la cellule pour la division qui se produit en phase M.

1.1.2 La mitose et la cytokinèse

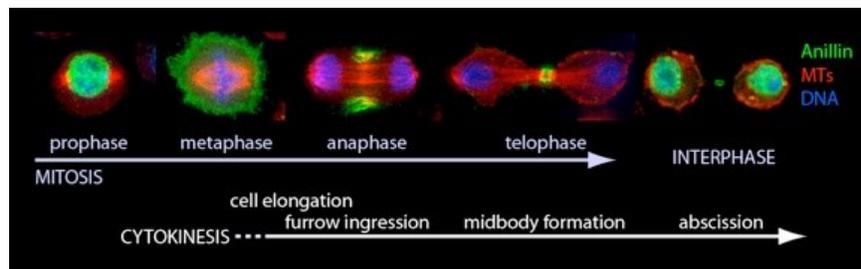


Figure 2 : La mitose et la cytokinèse sont des processus qui se superposent dans le temps.

Cellules S2 de Drosophile fixées au formaldéhyde et marquées pour anilline (vert), Tubulline (rouge) et ADN (bleu) à différentes étapes de la division cellulaire (prophase, métaphase, anaphase, télophase et interphase). Adaptée de Gilles Hickson.

1.1.2.1 La mitose

La mitose comprend quatre phases de base : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. Dans la littérature, on peut aussi trouver une subdivision de la mitose en 5 phases, divisant la prophase en une phase précoce (appelée prophase) et une

phase tardive (appelée prométaphase). Ces phases se produisent dans un ordre séquentiel strict et la cytokinèse, le processus de division du contenu cellulaire pour former deux nouvelles cellules, commence en anaphase (Figure 2) (Uetake & Sluder, 2010; Vermeulen et al., 2003).

- La prophase

La prophase est la première étape de la mitose. Les chromosomes se condensent par le recrutement de complexes protéiques condensines et l'enveloppe nucléaire commence à se désintégrer. Les centrioles et les microtubules constituent les centrosomes. Ces derniers se déplacent vers les extrémités opposées de la cellule. Chaque extrémité est appelée un pôle. Les microtubules commencent à former le fuseau mitotique et s'attachent aux centrioles (Jackman et al., 2003).

- La métaphase

La métaphase correspond au point à partir duquel toutes les paires de chromosomes sont complètement condensées, attachées au fuseau mitotique et alignées au centre de ce qu'on nomme la plaque métaphasique par les complexes protéiques cohésines. La traction des microtubules attachés aux kinétochores vers les pôles crée une tension à travers le complexe de cohésine garantissant que les chromatides sœurs sont correctement alignées sur la plaque métaphasique. Ce processus est à la base de l'un des nombreux points de contrôle du cycle cellulaire, appelé point de contrôle d'assemblage du fuseau mitotique (SAC) (Lara-Gonzalez et al., 2012; Nezi & Musacchio, 2009).

- L'anaphase

L'entrée dans l'anaphase est déclenchée par l'inactivation du complexe de promotion de l'anaphase (APC) qui suit la dégradation de la cycline mitotique. Pendant

l'anaphase, les microtubules des kinétochores se rétractent, augmentant la séparation des chromatides sœurs au fur et à mesure qu'elles se déplacent vers les pôles opposés du fuseau. L'anaphase peut être divisée en deux phases distinctes. Dans la première phase, appelée anaphase A, les chromosomes se déplacent vers les pôles, en s'éloignant de la plaque métaphasique avec la rétraction des microtubules. Dans la deuxième phase, l'anaphase B, les pôles mitotiques marqués par les centrosomes eux-mêmes se séparent par l'allongement d'un type spécifique de microtubule non kinétochorien, appelé microtubule polaire. L'étendue de la séparation des pôles varie d'une espèce à l'autre. La durée totale de l'anaphase est relativement courte, elle ne dure généralement que quelques minutes (Uhlmann et al., 1999; Yu et al., 2019). C'est aussi durant cette phase que commence la cytokinèse (Figure 2).

- La télophase

Phase terminale de la mitose. La membrane nucléaire se reforme autour des chromosomes séparés durant les phases précédentes. Les chromosomes se décondensent et la masse cytoplasmique se coupe en deux.

1.1.2.2 La cytokinèse

La cytokinèse est un processus en plusieurs étapes très conservé et hautement régulé qui aboutit en la séparation physique de la cellule mère en deux cellules filles. Ce processus commence en anaphase avec la formation du sillon de clivage et de l'AC se superposant ainsi avec la mitose (Figure 2). La cytokinèse est entraînée par la constriction de l'AC, une structure très dynamique composée d'actine et de myosine, qui une fois fermé, transitionne vers un AM plus stable orchestrant l'abscission (Green et al., 2013; Kechad et al., 2012). Toutefois, les mécanismes responsables de la détermination du site de clivage restent mal compris.

1.1.2.3 Détermination du plan de division

Trois modèles ont été proposés pour expliquer comment des signaux provenant des microtubules pourraient induire la formation d'un sillon de clivage. Dans ces modèles, deux populations de microtubules semblent coexister pour définir ce plan de division, les microtubules du fuseau central, et les microtubules astraux, dont les proportions peuvent varier d'une cellule à l'autre dépendamment du type cellulaire.

- La stimulation du fuseau central

Le modèle de stimulation équatoriale attribue le positionnement du sillon de clivage au fuseau central, un réseau dense de microtubules qui se chevauchent et se forme au début de l'anaphase (Figure 3). Par exemple, le placement d'une barrière entre un côté du fuseau central et le cortex cellulaire entraîne la formation de sillons uniquement du côté non obstrué (Cao & Wang, 1996).

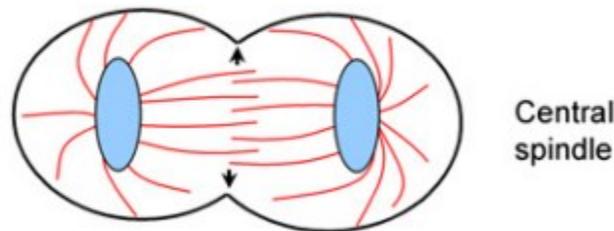


Figure 3 : Représentation schématique du modèle de détermination du plan de division reposant sur la stimulation du fuseau central.

Adapté de (Oliferenko et al., 2009)

- La stimulation astrale

Le modèle de stimulation astral stipule que la stimulation du cytoplasme cortical se produit près des extrémités distales des microtubules astraux. Des niveaux de stimulation suffisants pour provoquer des sillons ne se produisent que dans les zones équatoriales entre les astères. Ce modèle prédit correctement le positionnement et l'apparition de sillons dans deux expériences dans lesquelles la forme cellulaire a été manipulée en un sablier ou une forme cylindrique avant la division. Ces résultats sont cohérents avec les

théories de la stimulation équatoriale dans lesquelles les asters mitotiques stimulent de manière différentielle la future région du sillon (cortex équatorial) (Devore et al., 1989; Rappaport, 1961) (Figure 4).

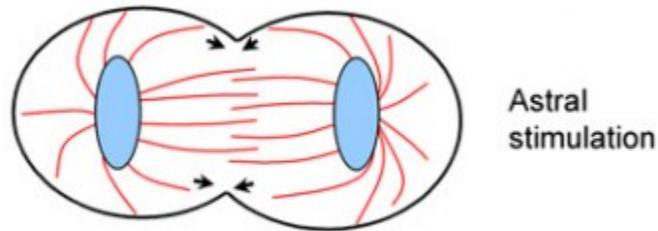


Figure 4 : Représentation schématique du modèle de détermination du plan de division reposant sur la stimulation astrale.
Adapté de (Oliferenko et al., 2009)

- La relaxation polaire

Le modèle de relaxation polaire propose que la relaxation du cortex cellulaire polaire se produit à l'aide de signaux provenant des réseaux de microtubules astraux inhibant la contractilité des pôles. Les régions polaires d'une cellule seraient moins contractiles en raison de la densité plus élevée de microtubules astraux (Figure 5) (White & Borisy, 1983). En accord avec cette conclusion, (Dechant & Glotzer, 2003) ont noté que chez des embryons de *Caenorhabditis elegans*, les sillons s'amorcent aux endroits où la densité de microtubules est la plus faible. Les deux modèles de relaxation polaire et stimulation équatoriale n'étant pas mutuellement exclusif, on peut émettre l'hypothèse que ces derniers peuvent fonctionner conjointement.

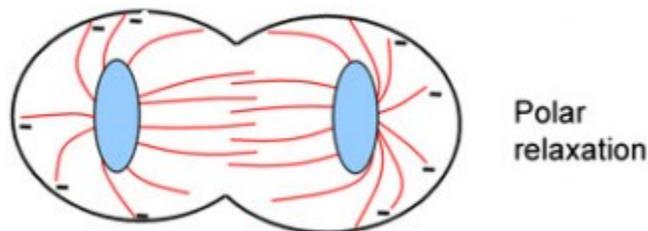


Figure 5 : Représentation schématique du modèle de détermination du plan de division reposant sur la relaxation polaire.
Adapté de (Oliferenko et al., 2009)

- Formation d'une région équatoriale riche en RhoA activée

Les trois modèles de détermination du plan de division discutés plus haut impliquent tous la formation d'une région équatoriale riche en RhoA activée. RhoA étant une GTPase, son activation nécessite une protéine GEF et son inactivation nécessite une protéine GAP. Alors que l'identité de la protéine GAP responsable de l'inactivation de RhoA durant la cytokinèse demeure un sujet controversé, il a été démontré que l'activation de RhoA dépend de la GEF, ECT-2 (*Pebble*) (Yüce et al., 2005) localisée au fuseau central grâce à son interaction avec MgcRacGAP (Wolfe & Glotzer, 2009) (Figure 6).

L'activation locale de RhoA est une étape indispensable à la formation de l'AC qui marque le début de la cytokinèse. Pour réussir la cytokinèse, les filaments d'actomyosine sont assemblés sur un réseau de protéines cytosquelettiques au niveau du site de clivage qui agissent comme un échafaudage et relient les filaments d'actomyosine à la membrane cellulaire. Parmi ces protéines cytosquelettiques, on retrouve des effecteurs de RhoA (Figure 6). Rho-kinase et la formine, Diaphanous, permettent l'assemblage des filaments d'actomyosine. L'anilline, par ses interactions avec différents effecteurs de RhoA et avec RhoA elle-même, sert comme protéine d'échafaudage indispensable (Kinoshita et al., 2002; A. J. Piekny & Glotzer, 2008; A. J. Piekny & Maddox, 2010). Citron kinase et les septines sont cruciales dans l'étape de formation et de maturation de l'AM (El Amine et al., 2013).

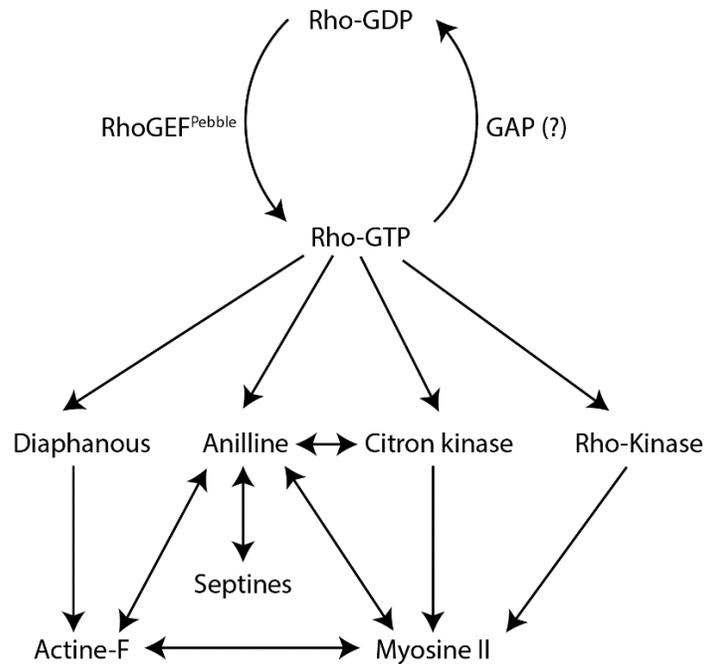


Figure 6 : Voie de signalisation Rho-GTP durant la cytokinèse.

La RhoGEF active Rho-GDP, lui permettant ensuite d'activer plusieurs effecteurs. Rho-GTP active Diaphanous, Anilline, citron kinase et Rho-kinase. L'anilline peut interagir avec un bon nombre de ces effecteurs de Rho-GTP.

1.1.2.4 La formation de l'anneau contractile

L'AC est une structure corticale très dynamique composée de filaments d'actine et de myosine-II. Lorsque RhoA est activée au niveau du cortex équatorial, elle favorise la polymérisation de l'actine et l'activation de la myosine-II via les protéines effectrices de RhoA spécifiquement au cortex équatorial. Rho-GTP favorise l'assemblage des filaments d'actine en activant des formines, en particulier mDia2, qui nucléent les filaments d'actine linéaires et non ramifiés (Kühn & Geyer, 2014). De plus, Rho-GTP favorise l'assemblage de la myosine-II en activant la kinase ROCK, qui active ensuite la myosine-II par deux mécanismes. Premièrement, elle phosphoryle directement sa chaîne légère (MRLC), favorisant son assemblage en filaments bipolaires et activant son activité motrice. Deuxièmement, ROCK phosphoryle et inhibe la myosine phosphatase, favorisant indirectement la phosphorylation de la MRLC (A. Piekny et al., 2005) (Figure 6). La citron kinase, Sticky en drosophile, est aussi capable de phosphoryler et d'activer la myosine-II (Yamashiro et al., 2003).

En plus de la polymérisation *de novo* de l'actine et de la formation de filaments bipolaires de myosine-II, le flux cortical de l'actine F et de la myosine-II peut favoriser l'accumulation équatoriale d'actomyosine. Contrairement aux sarcomères des muscles squelettiques, les filaments d'actomyosine de l'anneau contractile sont organisés comme un maillage de filaments dans un ordre aléatoire de polarité mixte (Spira et al., 2017). Au cours de la division cellulaire, l'anneau contractile génère la force de constriction nécessaire pour séparer une cellule en deux.

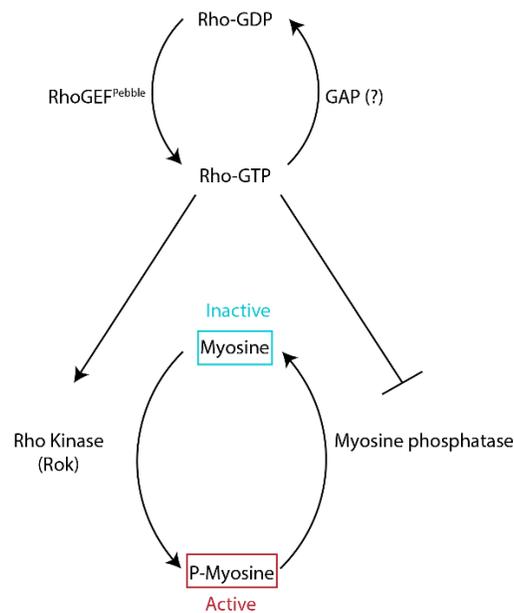


Figure 7 : Schéma montrant les deux mécanismes par lesquels Rho-GTP active la myosine-II. Le premier mécanisme implique l'activation de Rho-Kinase qui ensuite phosphoryle la myosine. Le second mécanisme implique l'inhibition de la myosine phosphatase qui déphosphoryle la myosine-II.

1.1.2.5 La constriction de l'anneau contractile

Sur la base d'une analogie avec le muscle, il a été proposé que le mouvement contractile soit généré via un mécanisme de glissement de filaments dans lequel les filaments de myosine-II bipolaires marchent le long des filaments d'actine au sein de réseaux organisés en sarcomères (Schroeder, 1975). Cependant, l'organisation des filaments d'actine en réseaux de sarcomères n'a pas été observée de manière

reproductible. De plus, l'orientation aléatoire des filaments d'actine et de myosine dans l'anneau contractile suggèrent la présence d'autres mécanismes de génération et de libération de tension. Il est important de noter que lorsque l'anneau se resserre, la section transversale de l'anneau contractile reste constante, ce qui suggère que le désassemblage de l'actine-F doit équilibrer la polymérisation en cours (Miller, 2011). De plus, il a été reporté que l'activité motrice de la myosine-II était facultative pour la cytokinèse dans des cellules mammifères (Ma et al., 2012). Dans ce modèle, la capacité de la myosine à se lier à l'actine est la seule condition requise pour réussir la cytokinèse.

Dans des modèles *in vitro*, il a été rapporté que l'anilline pouvait faire glisser deux filaments d'actine (Kučera et al., 2021). Dans cette étude, des filaments d'actine immobilisés sur une surface sont raliés ensemble par des molécules d'anilline qui les fait ensuite glisser les uns sur les autres pour maximiser leur chevauchement, d'une manière dépendante de la dépolymérisation de l'actine-F. Ces études contredisent le modèle traditionnel de constriction de l'anneau contractile et se basent plutôt sur la réticulation et la dépolymérisation de l'actine-F comme force conductrice de la constriction de l'anneau contractile.

1.1.2.6 La formation de l'AM et du midbody

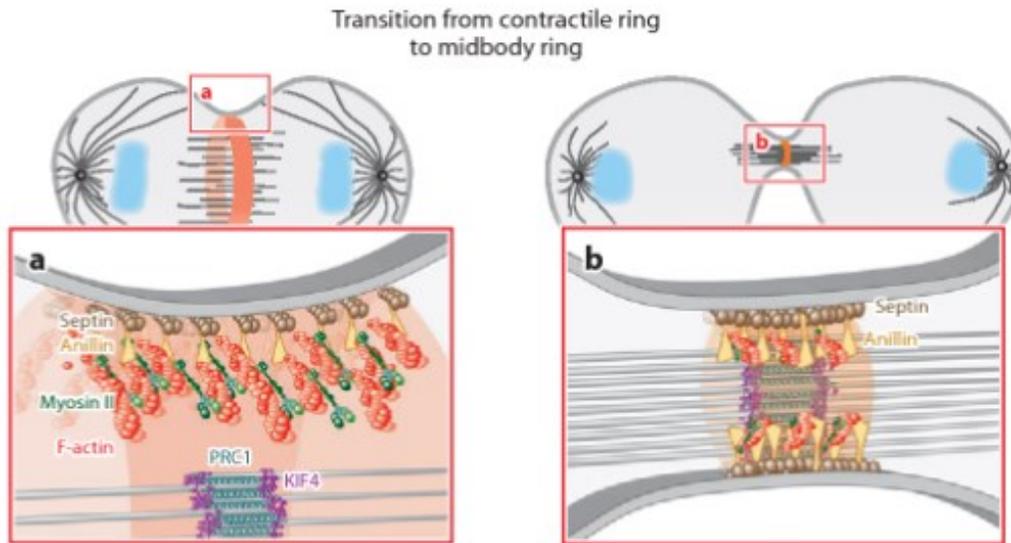


Figure 8 : représentation schématique des composants de l'AC et de l'AM.

Adaptée de (Green et al., 2012)

La nomenclature de l'AM est très variée dans la littérature. Dans ce mémoire, l'AM représente la région corticale issue directement de l'anneau contractile. La constriction de l'anneau contractile progresse jusqu'à compacter les microtubules centraux ramenant la membrane plasmique et les protéines du cytosquelette en une seule structure ultra dense surnommé l'AM (Figure 8). Cet anneau conserve les mêmes composants de l'anneau contractile, notamment l'anilline, la citron kinase ainsi que les filaments d'actine, de myosine II et de septines (Gai et al., 2011; Hu et al., 2012; Kechad et al., 2012; Madaule et al., 1998) (Figure 8). Chez la drosophile, les filaments d'actine sont, soit complètement perdus de l'AM, soit présents dans la structure, mais à des niveaux indétectables (El Amine et al., 2013).

Le midbody est la structure résultant de la compaction des microtubules du fuseau central au sein de l'AM. Dans le midbody on trouve des protéines du fuseau central comme centralspindlin, KIF4, ALIX et PRC1 (Lie-Jensen et al., 2019; Wolfe & Glotzer, 2009). Les protéines responsables de l'abscission sont recrutées dans les régions flanquant le midbody, notamment la machinerie ESCRT-III (le complexe de tri endosomal) (D'Avino et

al., 2008). Chez *Drosophila melanogaster*, centralspindlin et ALIX sont responsables du recrutement de la machinerie ESCRT-III (Lie-Jensen et al., 2019). L'ensemble de ces régions, l'AM, le midbody et les régions flanquant le midbody est appelé le pont intercellulaire.

1.2 L'abscission

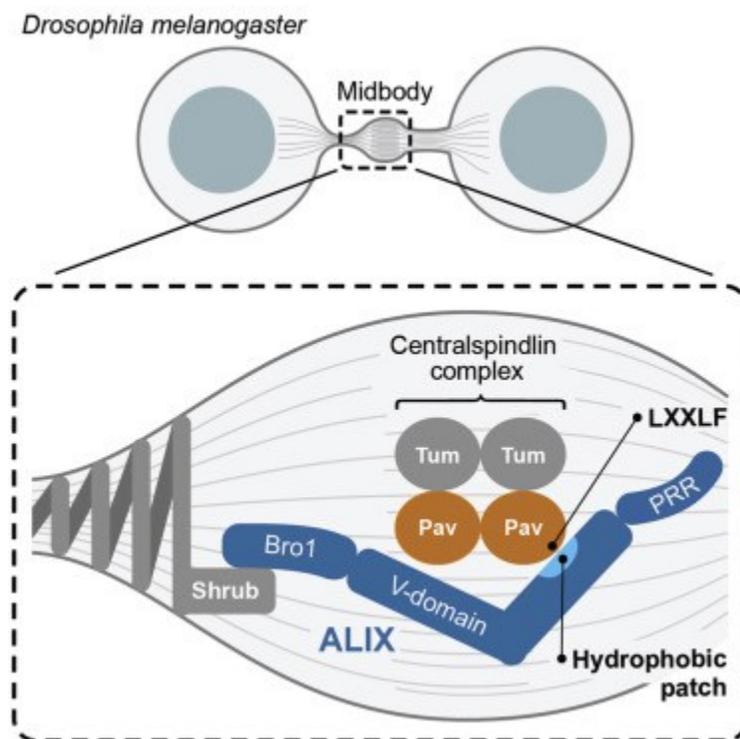


Figure 9 : représentation schématique des protéines impliquées dans le recrutement de Shrub aux régions flanquants le midbody.

Adapté de (Lie-Jensen et al., 2019)

L'abscission constitue la dernière étape de la cytokinèse durant laquelle le pont intercellulaire reliant les deux cellules filles est coupé. Durant l'abscission, la protéine d'échafaudage ALIX est recrutée par CEP55 chez les mammifères et par MKLP1/Pav (sous-unité de centralspindlin) chez *Drosophila melanogaster* (Figure 9) (Lie-Jensen et al., 2019; Morita et al., 2007; Zhao et al., 2006). L'accumulation d'ALIX et de TSG101 (une composante du complexe ESCRT-I) permet le recrutement de la machinerie ESCRT-III aux régions flanquant le midbody (Morita et al., 2007). La machinerie ESCRT-III va alors initier

la coupure du pont intercellulaire par polymérisation (Elia et al., 2011; Guizetti et al., 2011). Le midbody rémanent est soit hérité par une des cellules filles, soit perdu dans le cytoplasme. Ce midbody rémanent peut être internalisé par les cellules en interphase, où il réside dans le cytoplasme en tant que structure de signalisation liée à la membrane. Cette structure peut stimuler la prolifération dans certains types cellulaires (Peterman et al., 2019).

1.3 L'anilline dans la cytokinèse

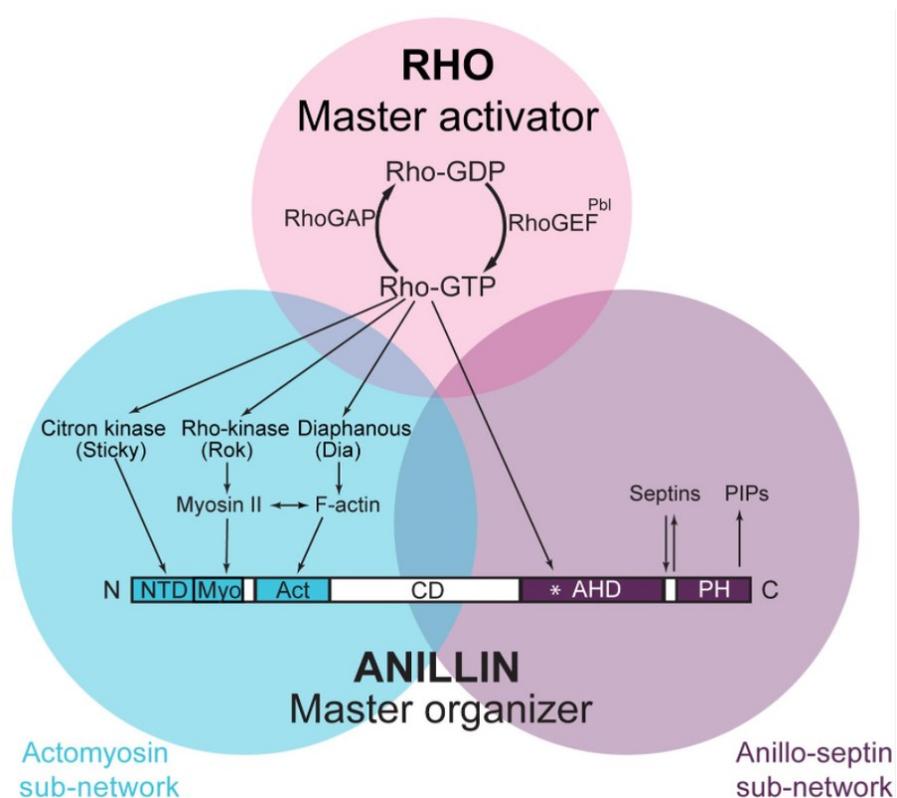


Figure 10 : représentation schématique des domaines de l'anilline ainsi que de ses interactions avec les effecteurs de Rho-GTP.

(Carim et al., 2020)

L'anilline est une protéine conservée avec une structure multi-domaine unique. Sa structure lui permet d'échafauder de multiples acteurs de la cytokinèse (A. J. Piekny & Maddox, 2010). Elle est considérée comme le maître organisateur de la cytokinèse, capable de se lier à un bon nombre d'effecteurs de Rho et à Rho elle-même (Figure 10). Le domaine NTD de l'anilline se lie à citron kinase Sticky chez *Drosophila melanogaster*

(El-amine et al., 2019). Le domaine MyoBD (Myosin Binding Domain) se lie à la myosine chez *Xenopus* (Straight et al., 2005). Le Domaine ActBD (Actin Binding Domain) est composé de trois sites de liaison à l'actine, identifiés A, B et C (Jananji et al., 2017). Le domaine central (CD) est peu conservé mais contient une séquence NLS responsable de la localisation nucléaire de l'anilline chez la drosophile. Le domaine AHD (Anillin Homology Domain) capable de lier MgcRacGAP (Tum) et Rho (D'Avino et al., 2008; A. J. Piekny & Glotzer, 2008). Le domaine PH (Pleckstrin Homology) de liaison à la membrane plasmique et aux septines (Blomberg et al., 1999; Oegema et al., 2000) (Figure 10).

L'anilline est d'abord nucléaire en interphase mais suite à la rupture de l'enveloppe nucléaire en métaphase, l'anilline est recrutée au cortex. Après l'activation de Rho par sa GEF ect-2/Pebble à la membrane plasmique équatoriale, l'anilline est recrutée au sillon de clivage avec l'anneau contractile où elle joue un rôle d'échafaudage crucial (Figure 2). Pour cause, la déplétion de l'anilline induit l'instabilité de l'anneau contractile, oscillant d'un pôle à l'autre de la cellule sans pouvoir former un AM (Kechad et al., 2012). Non seulement l'anilline accompagne l'anneau contractile dans sa constriction, mais aussi dans la transition de l'anneau contractile vers un AM. De plus, l'anilline joue un rôle critique dans le processus de maturation de l'AM. Ces processus requièrent des mécanismes concurrents de retrait (extrusion de membrane et le « *shedding* ») et de rétention de l'anilline, lors desquels il doit y avoir une balance entre ces deux mécanismes pour produire un AM stable et mature (El Amine et al., 2013).

- Le retrait dépendant de l'anilline C-terminale

L'anilline C-terminale, constituée des domaines AHD et PH, relie l'AM à la membrane plasmique par son interaction avec les septines. L'anilline C-terminale se localise sur des protubérances corticales qui s'étendent au-delà de l'anneau contractile et apparaissent comme traînant derrière sa fermeture (Kechad et al., 2012). Après la fermeture de l'anneau contractile, l'anilline C-terminale est complètement retirée de l'AM par processus d'extrusion « *shedding* ». C'est l'interaction du domaine PH de l'anilline avec

les septines qui est responsable du processus de retrait de l'anilline. La déplétion de la septine Pnut, comme la troncation du domaine PH de l'anilline, cause une rétention excessive de l'anilline à l'AM et inhibe le processus d'extrusion de la membrane (El Amine et al., 2013). Cette rétention excessive produit des AM immatures, beaucoup plus volumineux, détachés de la membrane plasmique et incapables de supporter la cytokinèse (Figure 11).

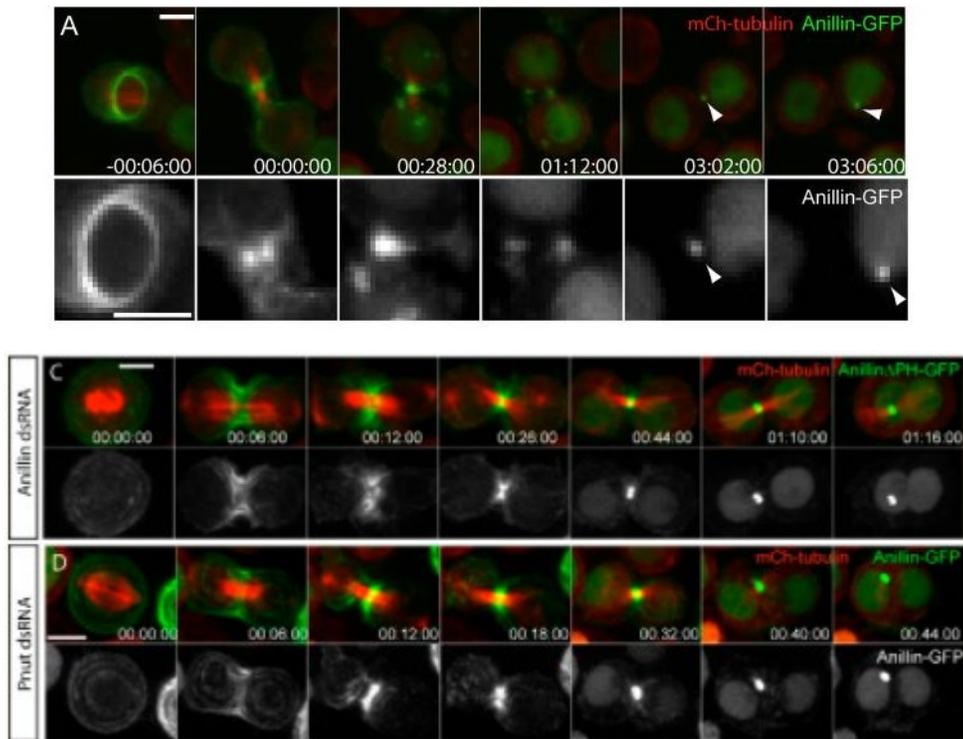


Figure 11 : l'interaction des septines avec le domaine PH de l'anilline est importante pour le processus de maturation de l'AM.

(A) Images d'une séquence de time-lapse montrant le recrutement de l'anilline-GFP (C) Images d'une séquence de time-lapse montrant le recrutement de l'anilline- Δ PH-GFP suite à la déplétion de l'anilline endogène. (D) Images d'une séquence de time-lapse montrant le recrutement de l'anilline FL suite à la déplétion de la septine Pnut. Adapté de (El Amine et al., 2013).

- La rétention dépendante de l'anilline N-terminale

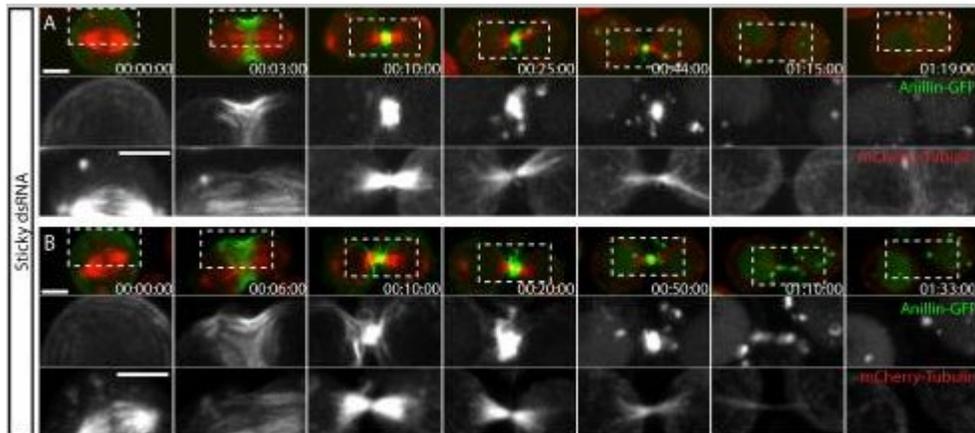


Figure 12 : La déplétion de la citron kinase, Sticky, inhibe la rétention de l'anilline à l'AM.
 (A-B) Images d'une séquence de time-lapse montrant le recrutement de l'anilline FL-GFP suite à la déplétion de Sticky. Adapté de (El Amine et al., 2013).

Alors que l'extrémité C-terminale de l'anilline est cruciale pour l'ancrage de l'AM à la membrane plasmique, l'extrémité anilline N-terminale, qui lie la kinase citron, l'actine et la myosine II, est importante pour l'intégrité de l'AM (Kechad et al., 2012). Les liaisons à l'actine assurent une bonne distribution de l'anilline le long de l'anneau contractile et les liaisons à Sticky assurent la rétention de l'anilline à l'AM. La déplétion de Sticky dans des cellules S2 de drosophile cause une augmentation des extrusions et le retrait complet de l'anilline de l'AM. Ultiment, ces cellules font des abscissions précoces ou bien échouent la cytokinèse (Figure 12) (El Amine et al., 2013). Curieusement, l'expression d'une anilline tronqué de son domaine NTD, anilline- Δ NTD-GFP, induit la formation d'un minuscule AM incapable de supporter la cytokinèse (El-amine et al., 2019). Ceci témoigne d'une rétention indépendante du domaine NTD de l'anilline. Sachant que l'actine-F est indétectable à l'AM chez *Drosophila melanogaster*, cette rétention de l'anilline- Δ NTD-GFP peut être attribuée aux liaisons de son MyoBD avec la myosine-II.

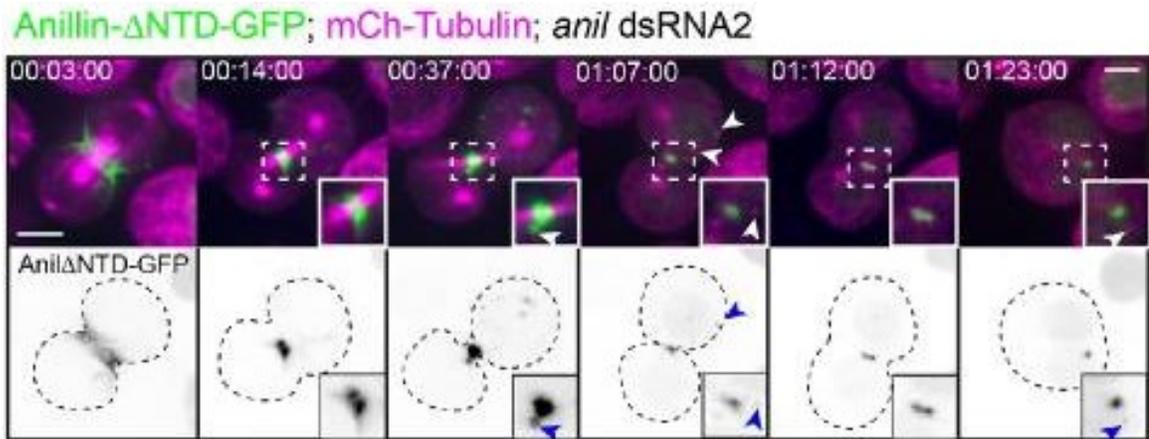


Figure 13 : La troncation du domaine NTD permet une certaine rétention de l'anilline à l'AM. Images d'une séquence de time-lapse montrant le recrutement de l'anilline- Δ NTD-GFP suite à la déplétion de l'anilline endogène. Adapté de (El-amine et al., 2019).

- Le domaine de liaison à la myosine de l'anilline (MyoBD)

Le MyoBD est un domaine peu étudié de l'anilline dont on ne connaît pas la fonction. Premièrement, la troncation des acides aminés 142-254 de l'anilline chez *Xenopus* inhibe sa capacité à extraire la myosine de lysats cellulaires (Straight et al., 2005). Cette interaction n'a jamais été testée dans un autre modèle et sa fonctionnalité demeure inconnue.

Deuxièmement, il a été rapporté que le MyoBD pourrait aussi interagir avec l'actine. Dans des essais de réticulation de l'actine F, le MyoActBDa de l'anilline (composé du MyoBD et d'un site de liaison à l'actine adjacent, l'ActBDa) est capable de réticuler l'actine F (Jananji et al., 2017). Puisque la réticulation de l'actine F demande au moins deux sites de liaisons à l'actine, la première hypothèse serait que le MyoBD contienne le deuxième site de liaison. La seconde hypothèse serait que le MyoActBDa est capable de se dimériser pour réticuler l'actine F.

Troisièmement, il a été rapporté que le MyoBD de l'anilline pouvait interagir avec la protéine F-BAR de la drosophile, syndapin, qui contribue au couplage de la membrane plasmique à l'AC durant la cytokinèse (Takeda et al., 2013).

Finalemment, l'alignement des séquences d'acides aminés de l'anilline chez *Drosophila melanogaster*, *Homo sapiens* et *Xenopus* dévoile l'existence d'un motif WEDD (216-219) très conservé qui pourrait bien jouer un rôle important dans la fonction du MyoBD (Figure 14A). De plus, la structure 3D de la région contenant le motif WEDD semble aussi être conservée. À l'aide de la base de données de structures prédites Alphafold2, on peut voir que le motif WEDD réside dans une hélice alpha dont la structure est très conservée (Figure 14B).

A

		1	NTD MyoBD	238	
sp	Q9V4P1	ANLN_DROME	MDPFTQHMLEKAEQRSRALGISNAS-----KFLPLVECSVPSSSATSASGG	45	
sp	Q9NQW6	ANLN_HUMAN	MDPFTKLLERTRARRENLRQKMAERPTAAPRSMTHAKRARQPLSEASNQ----QPLSGG	56	
sp	Q801E2	ANLN_XENLA	MDPFTKLLERTRARRENLRQKMDRPTAGTRTAALNKRPRELLEANHQ----PPAPAE	56	
			*****::**:: * * . * . : : * * * . . .		
sp	Q9V4P1	ANLN_DROME	DAGVLAAPRSRSPGGQSAASGGGKVVTLGKATLEASPAKPLRHYTAVNKENLDMGIEINI-	104	
sp	Q9NQW6	ANLN_HUMAN	EKKSCT-----KPSPSK---KRCSDNTEVEVSNLENKQP	87	
sp	Q801E2	ANLN_XENLA	EAKPSS-----KPSPSK---RRCSDNASTPDAGAENKQP	87	
			: : : : : * : : * . . * :		
sp	Q9V4P1	ANLN_DROME	-----TTDKPIGVQVEIQEQEVTDDDEEQA-----EGGALNPLLEAEVNOPLARLR	146	150
sp	Q9NQW6	ANLN_HUMAN	VESTSAKSCSPSPVSPQVQQAADTISDSVAVPASLLGMRRGLNSRLEATAA-----	139	
sp	Q801E2	ANLN_XENLA	KTELPKTELSAVAS-HQQLRATN-----QTPQVSLLSDEKEL-TASDVKDA-----	132	
			. : : : : * : . .		
sp	Q9V4P1	ANLN_DROME	DTSRSRLQRMGA---LYSNTDDLSSPIHRTEGQFHV-----TTGEEEDCGNRSSRQPKO	201	
sp	Q9NQW6	ANLN_HUMAN	SSVKTRMQKLAEQRRRNDN-DDMTDDIPESLFSMPSEEKAASPPRPLLS-NASATPVG	197	
sp	Q801E2	ANLN_XENLA	SSVKTRMQKLADQRRYNDN-NVSPSSSPP----AHVPPKDIIVSPPKQIPDVGNPTPVG	187	
			. : : * : : . : * : . : : : : : . . *		
sp	Q9V4P1	ANLN_DROME	RLGKLAALADTINQWEDDTSHEVHRLLEAPPKPH-SSRRAEKGPAPLPPKKDEVDEA	260	
sp	Q9NQW6	ANLN_HUMAN	RRGRLANLAATIGSWEDDVNHSFAKQNSVQEQPGTACLSKFSSASGASA-RINS-----	250	
sp	Q801E2	ANLN_XENLA	RRGRFANLAATIGSWEDDLSHPFVKPMNKQEKPGTACLSKESTTSSASA-SMNS-----	240	
			* : : * * * * . * * * * . : : * * * . : . : : . :		

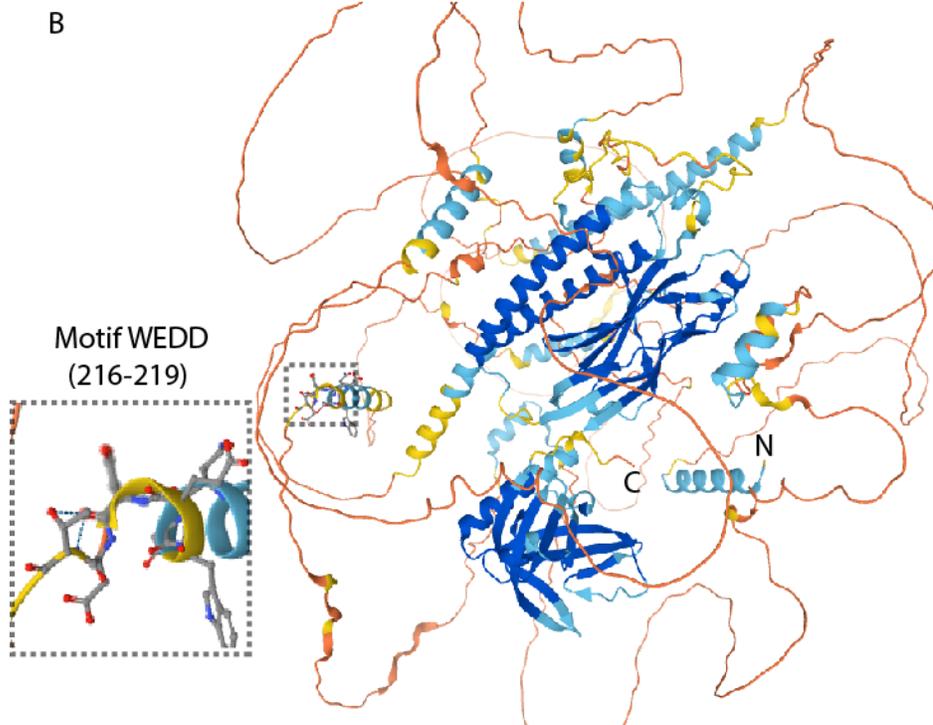


Figure 14 : Le motif WEDD est une séquence très conservée de l'anilline-MyoBD.

(A) Alignement de l'anilline chez la *Drosophila melanogaster*, *Homo sapiens* et *Xenopus* généré avec Clustal Omega. Encadré gris représente le domaine NTD (1-145) et l'encadré brun représente le domaine MyoBD (146-238) de l'anilline. L'encadré rose représente le motif WEDD (216-219) du MyoBD. (B) Structure 3D prédite de l'anilline de *Drosophila melanogaster* générée avec AlphaFold (Tunyasuvunakool et al., 2021).

2 Projet

2.1 Hypothèses et objectifs

L'anilline s'avère être une protéine cruciale durant la cytokinèse. Ses domaines d'interaction avec différentes composantes de l'AC et l'AM lui confèrent un rôle d'échafaudage clé. Il est donc important d'étudier et de décortiquer les domaines de l'anilline, de déterminer la protéine avec laquelle ils interagissent et de définir leur rôle dans la cytokinèse. Le MyoBD est l'un des domaines de l'anilline les moins étudiés, et dont la fonction est encore inconnue. Même s'il a été rapporté que le MyoBD pouvait lier la myosine-II chez *Xenopus*, la conservation de cette interaction et sa fonctionnalité n'ont jamais été démontrées.

L'hypothèse de ce projet est que le MyoBD, par son interaction avec la myosine-II, participe à la rétention de l'anilline à l'AM durant la cytokinèse.

Pour tester cette hypothèse, les objectifs de ce projet sont les suivants :

- 1) Déterminer le rôle du MyoBD durant la cytokinèse.
- 2) Tester l'interdépendance du MyoBD et de la myosine-II durant la cytokinèse.
- 3) Tester l'interaction MyoBD/Myosine II.

2.2 Approche expérimentale

Pour tester notre hypothèse, nous utilisons des cellules S2 de *Drosophila melanogaster* comme modèle. Ces cellules constituent un excellent modèle pour étudier la cytokinèse pour plusieurs raisons. D'abord, leur génome est assez simple et les gènes de la cytokinèse y sont bien conservés, facilitant la manipulation génétique. Ensuite, les cellules S2 sont très sensibles aux ARNi, et bien adaptées aux transfections stables et transitoires. Ces conditions nous permettent de faire des études structure-fonction de protéines impliquées dans la cytokinèse.

Dans le but de déterminer le rôle du MyoBD durant la cytokinèse. Nous avons généré différents mutants dépourvus du MyoBD ou contenant des mutations ponctuelles et nous avons testé leur capacité à sauver la cytokinèse dans un contexte où l'anilline

endogène a été réprimée par ARNi. Le comportement de ces mutants fusionnés à la GFP a été évalué en temps réel par microscopie confocale à disque rotatif dans des cellules S2 de drosophile. Leur localisation par rapport aux autres composantes de l'AC/AM et leur capacité à produire un AM robuste ont été définies.

Afin de tester l'interdépendance du MyoBD et de la myosine-II durant la cytokinèse, nous avons généré différents mutants contenant seulement le MyoBD ou le MyoBD et une partie de l'ActBD (MyoActBDa) et nous avons analysé leur recrutement dans des conditions où la myosine-II a été suractivée ou inactivée par ARNi.

Finalement, dans le but de tester l'interaction entre la MyoBD et la myosine, nous avons purifié les protéines recombinantes GST-MyoBD, GST-MyoActBDa, et GST-MyoActBDa-WEDD et nous avons évalué leurs capacités à extraire la myosine de lysats de cellules S2. Cette analyse est effectuée en présence ou en absence d'actine ou en coexprimant une forme constitutivement active ou inactive de la myosine pour mieux définir les contextes cellulaires dans lesquels cette interaction se produit. La combinaison des expériences de sauvetage dans les cellules S2, des tests d'interdépendance de recrutement et des essais biochimiques in vitro offrent un système de choix afin d'examiner pour la première fois les fonctions du MyoBD de l'anilline.

3 Matériel et méthodes

3.1 Biologie moléculaire et constructions

Toutes les constructions étaient déjà générées soit dans des plasmides pMT-GFP, pMT-mCherry (Promoteur de la métallothionéine) soit dans des plasmides pAc-GFP, pAc-mCherry (Promoteur *Act05C* constitutive). L'anilline Δ MyoBD code pour les acides aminés 1–146 et 238–1,239 et manque 92 acides aminés d'une manière similaire au MyoBD de *Xenopus* décrit dans Straight et al. (2005). L'anilline WEDD code pour l'anilline pleine longueur mais dont le motif WEDD (216-219) a été muté pour des alanines (Figure 14A). Les constructions d'anilline Δ MyoBD et WEDD (pMT-GFP et pMT-mCherry) n'étaient pas résistantes à l'ARNi contre l'anilline endogène. Pour les rendre résistantes, une procédure de digestion et de ligation a été suivie. La digestion avait pour gabarit les vecteurs d'anilline-FL-AHD-PH-ds-res-pENTRY (anilline pleine longueur et résistante double brin aux domaines AHD et PH), d'anilline- Δ MyoBD-pENTRY et d'anilline-WEDD-pENTRY. Le but était d'extraire la partie résistante et de l'insérer dans les plasmides non résistants. Les enzymes de restriction utilisées pour couper la partie résistante sont PmlI et AscI. Les digestions ont été séparées sur gel d'agarose et les bandes d'intérêt ont été extraites du gel et purifiées. Le fragment de 822 paires de base contenant une partie des domaines AHD-PH et la région résistante à l'ARNi a été insérée dans nos mutants d'anilline par ligation. Les réactions de ligation ont été transformées dans des bactéries DH5-alpha compétentes et incubées sur des plaques d'agar contenant du LB et de la Kanamycine pour sélectionner les bactéries positives. Les constructions d'anilline- Δ MyoBD-ds-res-pENTRY et d'anilline-WEDD-ds-res-pENTRY ont ensuite été recombinaisonnées par la LR Clonase dans des vecteurs destination contenant des séquences codant des molécules fluorescentes. Notez que le plasmide qui a été utilisé pour exprimer MRLC^{Sqh} était sous le contrôle du promoteur de l'actine endogène activé de manière constitutive (pAc). Il en est de même pour mCherry-Tubuline.

3.2 Culture cellulaire et ARNi

Les cellules S2 WT de *Drosophila melanogaster* (Schneider 2) ont été cultivées dans le milieu de culture Drosophila Gibco™ de Schneider contenant 10% de sérum fœtal bovin (FBS) inactivé par la chaleur et 1% de mélange antibiotique composé de pénicilline et de streptomycine à 25 ° C, sans ajout de CO₂.

Pour les transfections transitoires d'ADN, les cellules S2 de type sauvage ont été placées à une densité de $7,5 \times 10^5$ cellules/ml un jour avant la transfection. 1,0 µg de chaque plasmide pertinent a été transfecté à l'aide du réactif de transfection FuGENE HD et, par réaction, un rapport 3:1 (FuGENE HD:ADN) a été dilué dans du milieu de Schneider sans sérum dans un volume total de 100µl et incubé à température ambiante pendant 20 min avant d'être ajouté aux cellules dans le milieu de croissance normal. Le lendemain, 0,1 mM de CuSO₄ et 1 µg d'ARNi ont été ajoutés et 3 jours plus tard, l'expérience a été visualisée par microscopie confocale.

Pour générer des lignées cellulaires stables, des cellules S2 WT ont été placées à une densité de $7,5 \times 10^5$ cellules/ml et incubées à 25°C pendant une nuit avant d'être co-transfectées avec 1,0 µg de chaque plasmide respectif et 0,5 µg de pCoPuro (Invitrogen) en utilisant le réactif de transfection Cellfectin (Invitrogen). À partir de 48 heures après la transfection, les clones résistants ont été sélectionnés dans 0,5 mg/ml de puromycine (Invitrogen) pendant 4 semaines. Après la sélection, les cellules ont été cultivées sans puromycine dans un milieu supplémenté avec 10% de FBS pendant au moins 1 semaine.

Les ARNdb ont été générés à l'aide de kits de transcription in vitro (RiboMAX ; Promega), et les matrices d'ADN ont été générées par une amplification PCR en deux étapes à partir d'ADNc ou d'ADN génomique. En bref, dans le premier tour de PCR, les séquences d'amorces spécifiques aux gènes comprenaient une séquence d'ancrage 5' (5'-GGGCGGGT-3'), tandis que le deuxième tour de PCR utilisait une amorce d'ancrage T7 universelle (5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACGGGCGGGT-3'). La dernière étape a été la transcription in vitro du produit d'ADN contenant l'amorce T7 et notre gène à l'aide du mix d'enzyme T7 Express. Le produit transcrit est alors traité à la DNase, précipité à l'éthanol et lavé.

Les expériences d'ARNi ont été réalisées comme suit : les cellules transfectées ont été placées dans des plaques à 96 puits et incubées avec $\sim 1 \mu\text{g/ml}$ d'ARNdb. 3-5 jours avant l'imagerie ou la fixation, les cellules ont été transférées dans plaques 96 puits d'imagerie à fond de verre.

3.3 Microscopie

La microscopie à temps réel de cellules S2 de *Drosophila melanogaster* a été effectuée en utilisant un système confocal à disque rotatif (UltraVIEW Vox ; Perkin Elmer-Cetus) comprenant une unité de balayage (CSU-X1 ; Yokogawa America), une caméra à dispositif à couplage de charge (ORCA-R2 ; Hamamatsu Photonics), montée sur un microscope inversé (DMI6000 B ; Leica Microsystems), et équipée d'une platine piézoélectrique motorisée (Applied Scientific Instrumentation). Les cellules S2, préalablement transfectées et traitées aux ARNi + CuSO_4 (250 μM), sont placées dans une plaque d'imagerie 96 puits à température pièce 24h avant l'imagerie. Les images ont été prise avec un objectif d'immersion à l'huile 63x ou avec un objectif 40x. Toutes les images ont été prise avec une caméra ajustée à un *binning* 2x2 et recueillies et traitées avec le logiciel Volocity 6.3 (Perkin-Elmer).

3.4 FRAP

L'expérience FRAP a été réalisée à l'aide du module PhotoKinesis (PerkinElmer) contrôlé par le logiciel Volocity 6.3. Des piles de 10 sections z de 1 μm d'épaisseur ont été acquises avec un objectif 63x et un *binning* 2 x 2. L'acquisition s'est faite à 200 ms pendant les 30 premières secondes après le blanchiment d'une région d'intérêt (ROI) pré-défini. Toutes les valeurs d'intensité dans les expériences FRAP ont été normalisées au premier point temporel d'acquisition. Le demi temps de récupération a été automatiquement calculé par Volocity 6.3 Pour l'analyse statistique, un test t non apparié a été effectué en utilisant Prism (GraphPad Software).

3.5 Quantification des volumes et intensités des AM

Les mesures du volume des AM ont été obtenues à l'aide de l'outil Volocity 6.3 « *select objects by percent intensity* ». Cet outil permet de discriminer les objets selon le seuil d'intensité indiqué. Le seuil d'intensité a été choisi comme suit : moyenne des intensités au cytoplasme+(moyenne des intensités au cytoplasme/2). Ce seuil nous permet de sélectionner les régions où la protéine d'intérêt a été recrutée sans sélectionner l'arrière-plan ou le cytoplasme. Le volumes de ces régions de recrutement a été déterminé empiriquement pour chaque construction séparément. Ces valeurs ont ensuite été normalisées par rapport à la valeur du volume de l'AM immature (fin de la constriction de l'AC).

Les mesures d'intensité des AM ont été effectuées à l'aide de Volocity 6.3. Les constructions d'anilline Fl et Δ MyoBD ont été coexprimées dans les mêmes cellules mais avec différents marqueurs. Une ROI, fixe, entourant l'AM, a été dessinée à la main pour chaque séquence d'image (1 séquence chaque 10 minutes durant 120 minutes). L'intensité de fluorescence de cette ROI fixe a été mesurée grâce à Volocity « *measurement tool* ». Ces valeurs ont ensuite été normalisées par rapport à la valeur des intensités de fluorescence de l'AM immature.

3.6 Expression de protéines recombinantes

Les constructions contenant la GST ont été utilisés pour transformer des bactéries *E. coli* BL21. Ces bactéries transformées ont été utilisées pour inoculer 250 ml de milieu LB+AMP qui a été incubé sous agitateur à 37°C. Après avoir atteint une densité optique de 0.6 à (OD600), 1 mM d'isopropyl β -d galactosidase (IPTG) a été ajouté à la culture. Les cultures ont ensuite été incubées à 37°C pendant 4 h sous agitateur et les bactéries ont été récoltées par centrifugation à 6000 r/min pendant 20 min (4 °C) et lavées avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) glacée. Les bactéries lavées ont été resuspendues dans du tampon de lyse (20 mM HEPES, pH 7.4, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 1 mM dithiothreitol, 0.2 mg/ml Pefabloc), supplémenté

avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases, et lysées sur glace pendant 2h. Après sonication, une centrifugation à 4°C, 12,000 x g pour 20 min a été effectuée pour clarifier le lysat. Des billes de Glutathione sepharose (GE healthcare) préalablement lavées ont été ajoutées au lysat et le mélange a été incubé à 4°C sous rotation durant la nuit. La fraction des protéines taguées avec la GST et liées aux billes a été séparée de la fraction non liée par centrifugation 4°C, 4500 rpm durant 15 minutes suivie par trois lavages dans du tampon de lyse HMNT (20 mM HEPES, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 0.1 M NaCl, 0.5% Triton X-100).

3.7 Essai Pull down

Pour tester l'interaction de l'anilline-MyoBD et la myosine-II, une lignée S2 exprimant MRLC^{S^{qh}}-GFP a été cultivée dans un flask T75 pour 7 jours. Après isolation du culot par centrifugation (1500 rpm, 5 min à 4°C), les cellules ont été lysées avec du tampon de lyse HMNT (20 mM HEPES, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 0.1 M NaCl, 0.5% Triton X-100) supplémenté avec des tablettes d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases. Le temps d'incubation de la lyse était de 1h30 avec des mélanges fréquents (vortex chaque 15 minutes). Le lysat a été clarifié par centrifugation, 12,000 rpm, 4°C pendant 10 minutes dont on a gradé seulement le surnageant contenant les protéines solubles. Nos constructions, couplées à la GST et fixées sur billes, ont été ajoutées au lysat clarifié et incubées à 4°C sous rotation durant la nuit. Les billes ont été recueillies par une brève centrifugation (5000 rpm, 5 minutes à 4°C) et lavées quatre fois dans un tampon de lavage HMNT. Les billes lavées ont été remises en suspension dans un tampon de chargement 1x SDS-Sample buffer et bouillies pendant 5 minutes (100°C) avant la séparation par SDS-PAGE.

3.8 Immunoblot

Les échantillons ont été séparés par SDS-PAGE sur un gel à 10% avant d'être transférés sur une membrane PVDF. Les membranes ont été bloquées avec 5 % (p/v) de lait écrémé

dans 0,1 % de Tween 20/TBS-T (10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 150 mM NaCl) et incubées pendant 1 h à température pièce. Ensuite, les membranes ont été placées dans une solution d'anticorps primaires (Anti-GFP ou Anti-P-MRLC^{Sqh}) dans le tampon de blocage (lait écrémé à 5 % (p/v) dans 0,1 % de Tween 20/TBS-T) et incubés à 4 °C pendant la nuit. Les membranes ont été lavées 3 fois au TBS-T et transférées dans une solution d'anticorps secondaires anti-Rabbit (1:5000) conjugués à la horseradish peroxydase, incubation d'1 heure à 4 °C. Les membranes ont été lavées 4 fois au TBS-T et les blots ont été visualisés avec Clarity Western ECL substrate (Laboratoires Bio-Rad).

3.9 Immunofluorescence

Les cellules S2 transfectées préalablement avec MRLC^{Sqh}-GFP ont été transférées dans des plaques d'imagerie à fond de verre 96 puits ≥ 4 h avant la fixation pendant 5 min dans du formaldéhyde à 4 %/0,1 % de glutaraldéhyde dans du PBS. Après perméabilisation et blocage dans du PBS contenant 0,1 % de Triton X-100 (tampon PTX) et 5 % de Normal Goat Serum, les cellules ont été incubées avec des anticorps primaires (Chicken anti-Anilline, utilisé à 1:1000 ; et Mouse anti-P-MRLC^{Sqh}, utilisé à 1:400) à 4°C pendant une nuit, lavées avec le tampon PTX, et incubées pendant 1 h avec des anticorps secondaires conjugués à Alexa Fluor 546, ou Alexa Fluor 647 (1:500). Le Hoechst 33258 (1:500) a été ajouté en même temps que les anticorps secondaires. Les cellules ont été lavées dans du PTX et montées dans du Fluoromount-G (SouthernBiotech) avant l'imagerie.

3.10 Logiciels

L'acquisition et l'analyse des images ont été faites grâce au logiciel Volocity 6.3. Les images utilisées pour les figures ont été traitées à l'aide de Photoshop CS (Adobe) et assemblées sous forme de figures à l'aide d'Illustrator CS (Adobe). Les graphiques de données ainsi que les tests statistiques ont été réalisés à l'aide de Prism (GraphPad Software) ou d'Excel (Microsoft).

4 Résultats

4.1 Étude du comportement de mutants d'anilline susceptibles de ne plus se lier à la myosine

4.1.1 L'ARNi contre l'anilline est efficace

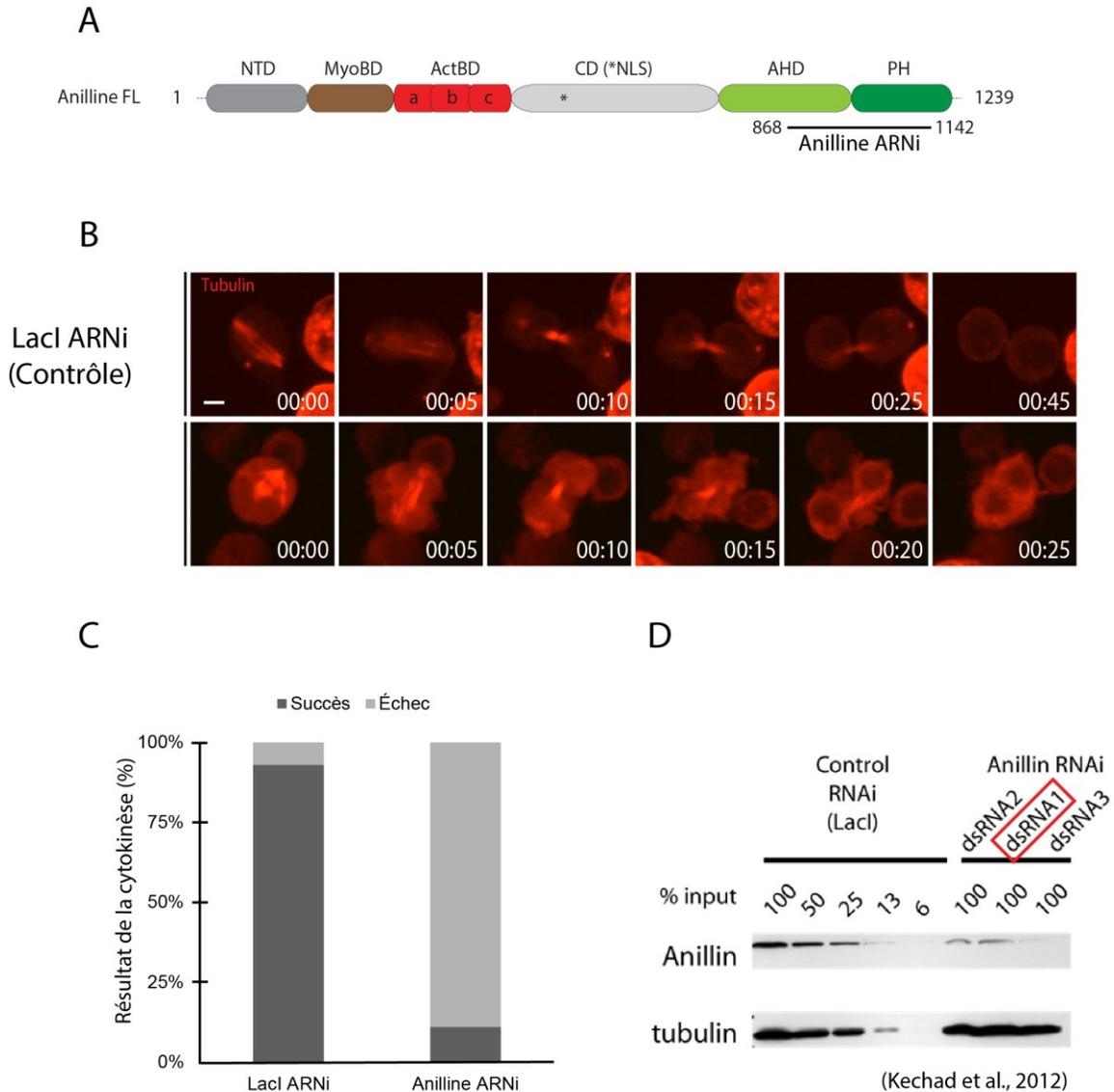


Figure 15 : L'ARNi contre l'anilline augmente considérablement le taux d'échec de la cytokinèse. (A) Représentation schématique de l'anilline FL (pleine longueur). NTD N-Terminal Domain; MyoBD Myosin Binding Domain; ActBD Actin Binding Domain; CD Central Domain; AHD Anillin Homology Domain; PH Pleckstrin Homology. L'ARNi (ARNdb) généré contre l'anilline cible la région AHD-PH entre les acides aminés 868-1142. (B) Images d'une séquence de time-lapse

montrant le recrutement de mCherry-tubulline lors de la cytokinèse en présence d'ARNi contre LacI (contrôle) ou contre l'anilline. ARNi durant 3 jours. Projection d'intensité maximale de 11 z confocaux (1 μm par tranche), objectif 40x. La barre représente 5 μm . (C) Résultats de la cytokinèse, ARNi durant trois jours. LacI (Contrôle) (n=2, N=132), anilline ARNi (n=2, N=92). (D) Analyse par immunoblot de cellules S2 non transfectées traitées pendant 72 h avec des dsRNAs de contrôle (LacI) ou d'anilline (adaptée de Kechad et al., 2012). DsRNA1 (encadré rouge) représente l'ARNi contre l'anilline utilisé dans ce mémoire.

Ayant pour but de réprimer efficacement les niveaux d'expression de l'anilline endogène, un ARNdb ciblant la région de l'ARNm codant une partie des domaines AHD et PH de l'anilline a été généré (868-1142 AA) (Figure 15A). Une expérience de sauvetage a été effectuée sur des cellules S2 exprimant seulement mCherry-tubulline afin de montrer l'efficacité de l'ARNi contre l'anilline. La tubuline nous a permis de suivre les tentatives de division en temps réel et de comptabiliser les échecs suite à la déplétion de l'anilline endogène (Figure 15B). L'ARNi qui a servi de contrôle négatif ciblait le gène LacI, absent du génome de *Drosophila melanogaster*. Contrairement aux contrôles, les cellules déplétées de l'anilline endogène n'arrivaient pas à former des AM, même si elles étaient capables de former un AC et de soutenir sa constriction (Figure 15B)

Le pourcentage de cellules ayant subi un échec de la cytokinèse après trois jours de déplétion d'anilline endogène était de 89%, alors qu'avec le contrôle, LacI ARNi, il n'y en a eu que 11% (Figure 15C). Ces résultats démontrent que l'ARNi généré contre l'anilline est bien efficace. De plus, l'efficacité de cet ARNi a été testée par immunoblot (Figure 15D) (Kechad et al., 2012). Il est à noter que tout au long de ce mémoire, les constructions d'anilline utilisées sont toutes résistantes à cet ARNi. De ce fait, nous serons capables de réprimer efficacement l'anilline endogène sans perturber les constructions d'anilline exogène.

4.1.2 Le MyoBD est facultatif pour une grande partie la cytokinèse

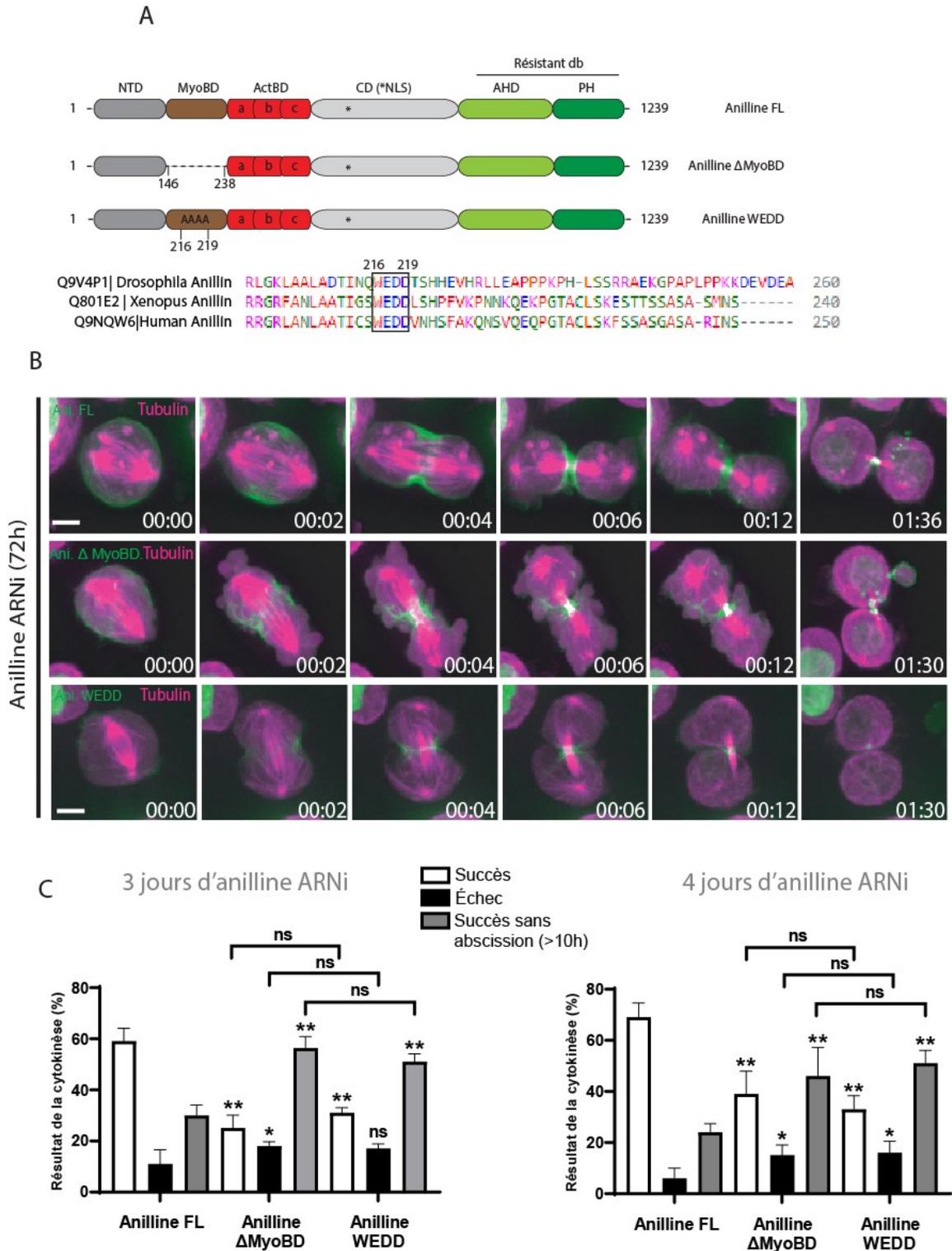


Figure 16 : Les mutants anilline-ΔMyoBD et anilline-WEDD sauvent en grande partie la cytokinèse.

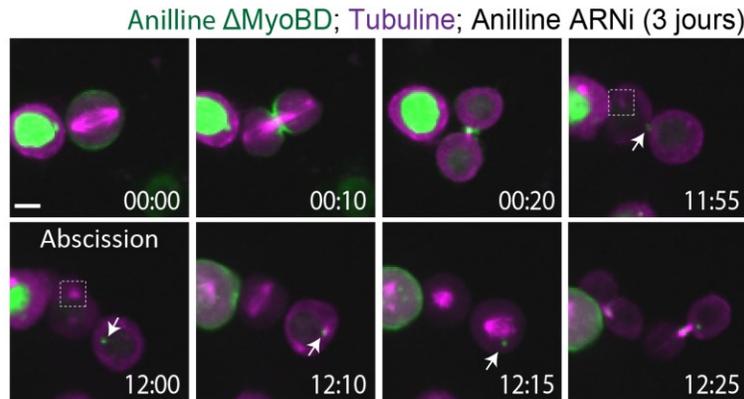
(A) Représentation schématique de l'anilline FL (pleine longueur), anilline Δ MyoBD, troncation de (146-238), anilline WEDD (le motif WEDD, entre les acides aminés 216-219, a été muté pour des Alanines). Ces constructions sont résistantes à l'ARN double brin (868-1142) utilisé pour réprimer l'anilline endogène. Alignement d'anilline FL chez la *Drosophila melanogaster*, *Homo sapiens* et *Xenopus* a été généré avec Clustal Omega. La séquence représente une partie du MyoBD dont le motif WEDD (216-219) est particulièrement conservé (encadré noir). (B) Images d'une séquence de time-lapse montrant le recrutement d'anilline FL, Δ MyoBD et WEDD fusionnés à la GFP, co-exprimé avec Tubulline-mCherry lors de la cytokinèse. Projection d'intensité maximale de 11 z confocaux (1 μ m par tranche), objectif 63x. La barre représente 5 μ m. L'anilline endogène a été réprimée par de l'ARNi pendant 3 jours. (C) Quantification du résultat de la cytokinèse; Succès avec abscission; Échec=cellules binucléaire; Succès sans abscission=Abscission retardée (plus de 10 heures sans abscission). 3 jours d'ARNi, anilline-FL-GFP (n=3, N=108), anilline- Δ MyoBD-GFP (n=3, N=104), anilline-WEDD-GFP (n=3, N=98). 4 jours d'ARNi, anilline-FL-GFP (n=3, N=85), anilline- Δ MyoBD-GFP (n=3, N=93), anilline-WEDD-GFP (n=3, N=91). Les moyennes \pm les écart-types sont illustrés; *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001 et ns = non-significatif pour un test statistique post-hoc de Games-Howell

Ayant testé l'efficacité de l'ARNdb généré contre l'anilline, nous voulions analyser l'effet de la troncation ou de la mutation du MyoBD de l'anilline durant la cytokinèse. Les mutants anilline Δ MyoBD et anilline WEDD ont été synthétisés et fusionnés à la GFP, puis analysés par microscopie confocale dans le but de caractériser leur comportement, ainsi que leur habilité à sauver la cytokinèse. Ces mutants sont tous résistants à l'ARNdb généré contre l'anilline. Le motif WEDD contenu dans le MyoBD s'avère être conservé, ce qui lui confère une potentielle importance fonctionnelle. Pour cette raison, chaque acide aminé de ce motif a été muté pour une Alanine (Figure 16A). Ces constructions d'anilline ont été transfectées dans des cellules S2 avec tubuline-mCherry pour observer leurs effets sur le déroulement de la cytokinèse suite à la déplétion de l'anilline endogène (Figure 16B). On note que comparativement à l'anilline FL, l'anilline Δ MyoBD et l'anilline WEDD démontrent beaucoup d'extrusion de membrane, beaucoup de *blebbing* et des AM plus petits. Toutefois, les trois constructions ont réussi à sauver en grande partie la cytokinèse. Après 3 jours de déplétion de l'anilline endogène, on note une augmentation des échecs de seulement 7% (p<0,05) et 6% (ns) respectivement chez les cellules exprimant l'anilline Δ MyoBD ou l'anilline WEDD. Après 4 jours de déplétion de l'anilline endogène, on note une augmentation des échecs de seulement 9% (p<0,05) et 10% (p<0,05) respectivement chez les cellules exprimant l'anilline Δ MyoBD ou l'anilline WEDD (Figure 16C). Malgré un sauvetage de la cytokinèse, la quantification des expériences de sauvetage a démontré

un retard d'abscission flagrant chez les cellules transfectées avec l'anilline Δ MyoBD et l'anilline WEDD après 3 jours et 4 jours de déplétion de l'anilline endogène (Figure 16C). Comparé à l'anilline FL (Anilline pleine longueur, sauvage), on note 27% ($p < 0,01$) et 22% ($p < 0,01$) de délais d'abscission de plus chez les cellules exprimant respectivement l'anilline Δ MyoBD et l'anilline WEDD après 3 jours de déplétion de l'anilline endogène. On note 21% ($p < 0,01$) et 26% ($p < 0,01$) de délais d'abscission de plus chez les cellules exprimant respectivement l'anilline Δ MyoBD et l'anilline WEDD. Ces délais d'abscission sont comptabilisés lorsque deux cellules passent plus de 10 heures attachées avec un AM sans qu'il y ait abscission, dépassant ainsi la limite de temps d'imagerie de chaque expérience (Figure 31 Annexe). Ces résultats montrent que l'expression exogène de l'anilline- Δ MyoBD-GFP et de l'anilline-WEDD-GFP produit un phénotype similaire suggérant que le motif WEDD est nécessaire pour la fonction du MyoBD.

4.1.3 La troncation du MyoBD provoque des retards/problèmes d'abscission

A



B

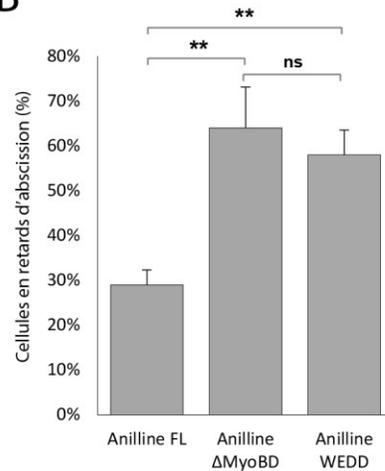


Figure 17 : La perte de fonction du MyoBD provoque des retards d'abscission.

(A) Images d'une séquence de time-lapse montrant le recrutement d'anilline Δ MyoBD-GFP, co-exprimé avec mCherry-tubuline lors de la cytokinèse suite à la déplétion de l'anilline endogène. Les flèches blanches montrent l'AM et les encadrés blancs montrent les centrosomes. Projection d'intensité maximale de 11 z confocaux (1 μ m par tranche), objectif 40x. La barre représente 5 μ m. L'anilline endogène a été réprimée par de l'ARNi pendant 3 jours. (B) Retards d'abscission observés chez des cellules exprimant l'anilline-FL-GFP (n=3, N=67), l'anilline- Δ MyoBD-GFP (n=3, N=74) ou l'anilline-WEDD-GFP (n=3, N=69). Succès avec abscission, représente toutes les cellules qui ont fait l'abscission durant la durée de l'imagerie. Succès sans abscission, représente toutes les cellules qui, malgré la formation d'un AM, n'ont pas réussi à faire l'abscission durant plus de 10h pendant la durée d'imagerie. Les moyennes \pm les écart-types sont illustrés; *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001 et ns = non-significatif pour un test statistique post-hoc de Games-Howell.

Nos résultats précédents ont indiqué que l'anilline Δ MyoBD et l'anilline WEDD provoquaient des retards d'abscission. Afin d'augmenter nos chances de capturer ce phénotype, la durée d'imagerie a été prolongée de 15 heures à 24 heures consécutives,

durant lesquelles on observe une cellule exprimant l'anilline Δ MyoBD entreprendre une division d'apparence normale (Figure 17A). Cependant, après avoir formé un AM à 20 minutes post-anaphase, les deux cellules filles restent attachées jusqu'à la prochaine division cellulaire, 11 heures 40 minutes plus tard. L'encadré blanc montre le recrutement de la mCherry-tubuline aux centrosomes, juste avant la division cellulaire, coïncidant avec le moment de l'abscission à 12 heures post-anaphase (Figure 17A). Certaines cellules exprimant l'anilline Δ MyoBD ne font l'abscission qu'après plusieurs divisions cellulaires. Dans ce cas, quatre cellules encore attachées par 3 AM (flèches blanches) passent 12h sans faire d'abscission (Figure 33 Annexe). L'abscission n'est survenue que quelques minutes avant que l'une des cellules filles ne rentre en division cellulaire. À des fins de comparaison, le phénotype contrôle (Anilline FL) se trouve à la (Figure 16B).

La quantification des temps d'abscission montre que l'anilline Δ MyoBD et l'anilline WEDD ont provoqué respectivement 35% et 29% significativement plus de retards d'abscission que l'anilline FL ($p < 0,01$) (Figure 17B).

4.1.4 Le MyoBD participe à la rétention de l'anilline à l'AM

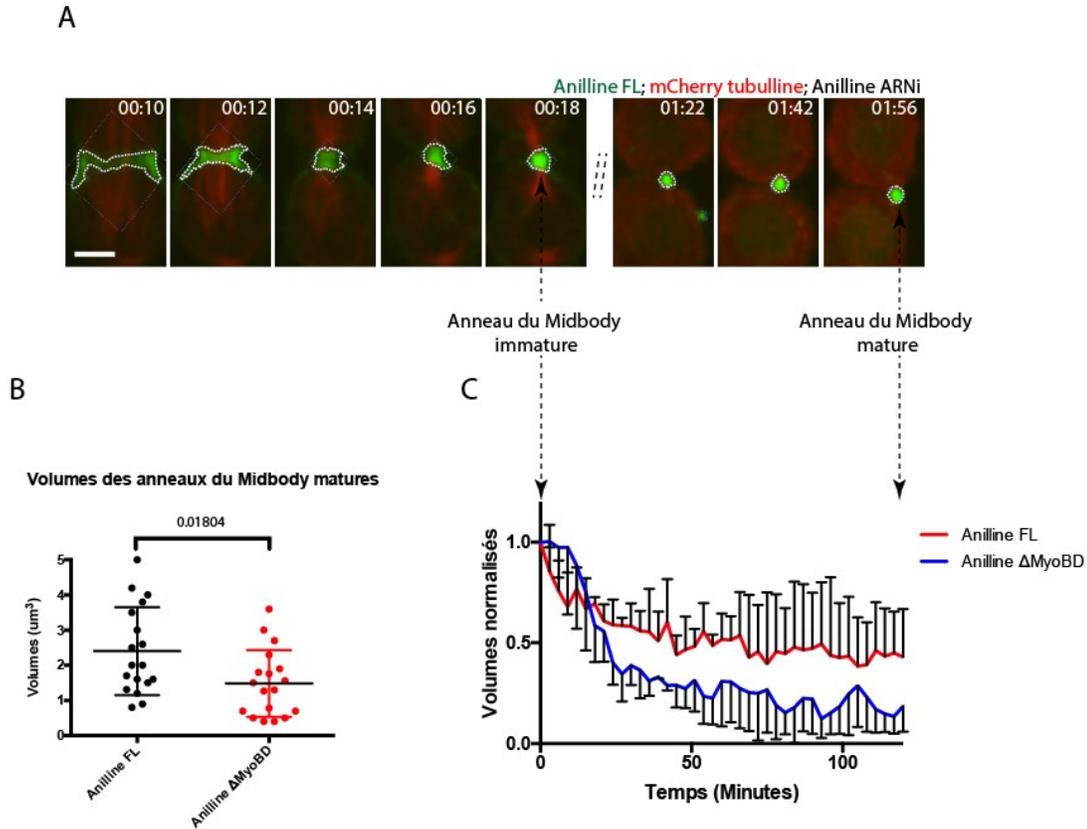


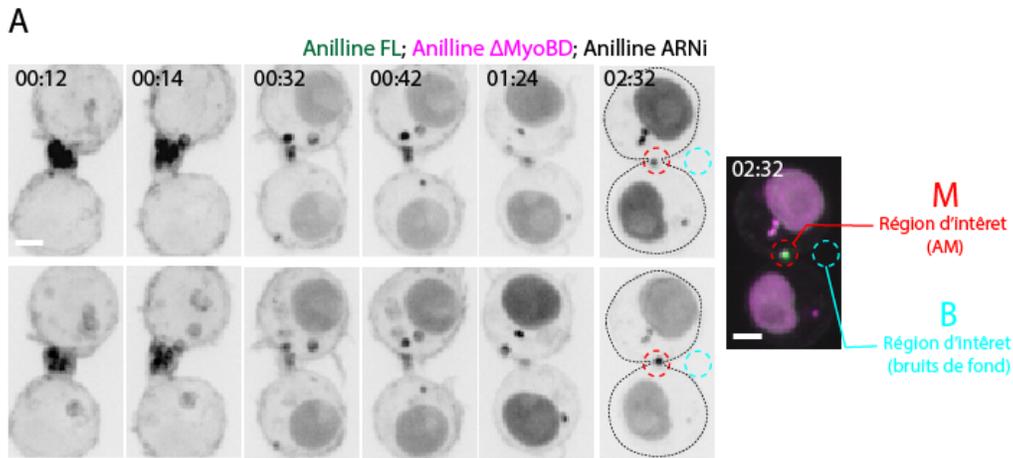
Figure 18 : L'anilline Δ MyoBD produit des AM moins volumineux que l'anilline FL.

(A) Images d'une séquence de time-lapse montrant le recrutement d'anilline-FL-GFP, co-exprimé avec mCherry-tubuline, lors de la cytokinèse. Cellule servant d'exemple montrant le ROI (pointillés blanches), dessiné par le logiciel volocity 6.3, permettant de traquer le recrutement de l'anilline et de calculer le volume qu'elle occupe durant la cytokinèse. Anilline ARNi (3 jours). Projection de 11 z (1 μ m par tranche), objectif 63x. La barre représente 5 μ m. (B) Quantifications des volumes des AM matures produits par l'anilline FL (n=3, N=18) et l'anilline Δ MyoBD (n=3, N=16) sur des images de séquences de time-lapse. Le Midbody est considéré immature à 18 min post-anaphase et mature à 2h post-anaphase. Les moyennes \pm les écart-types sont illustrés; p=0.01804, significatif pour un test statistique post-hoc de Games-Howell. (C) Volumes normalisés des AM produits par l'anilline FL et l'anilline Δ MyoBD (n=2, N=13) sur le temps. t=0 minutes correspond au volume de l'AM immature et t=120 minutes correspond au volume de l'AM mature.

Nos résultats ont montré que le mutant anilline Δ MyoBD arrivait à sauver en grande partie la déplétion de l'anilline endogène durant la cytokinèse. Toutefois, on a fréquemment observé la formation d'AM plus petits en tailles comparativement à ceux formés par l'anilline FL.

Afin de vérifier ces observations, des quantifications du volume de ces AM ont été effectués en utilisant le logiciel Volocity 6.3. Une ROI dessinée automatiquement par ce logiciel, en utilisant un seuil de fluorescence permet de traquer le recrutement des constructions d'anilline, et de quantifier le volume qu'elles occupent à travers le temps (Figure 18A). À 18 minutes post-anaphase, l'anilline forme un AM immature et au bout de 2 heures, l'AM est considéré mature. Ainsi, la construction d'anilline Δ MyoBD produit des AM matures significativement moins volumineux que ceux produits par l'anilline FL (Figure 18B). Ce résultat ne nous donne des indications que sur le volume final, sans prendre en compte le volume initial.

Le suivi du volume normalisé des AM produits par ces deux constructions sur le temps permet d'observer la progression des volumes, d'une manière comparable, durant la cytokinèse (Figure 18C). Pour chaque construction, la normalisation a été faite en divisant respectivement chaque volume dans le temps par son volume au $t=0$ (AM immature). On observe que, proportionnellement à leurs volumes initiaux respectifs ($t=0$), les volumes des AM produits par l'anilline Δ MyoBD diminuent plus que ceux produits par l'anilline FL durant la période de maturation de l'AM.



B

Intensité de fluorescence de l'AM normalisée à un temps t

$$\frac{\sum M_t - \sum B_t}{\sum M_{t=0} - \sum B_{t=0}}$$

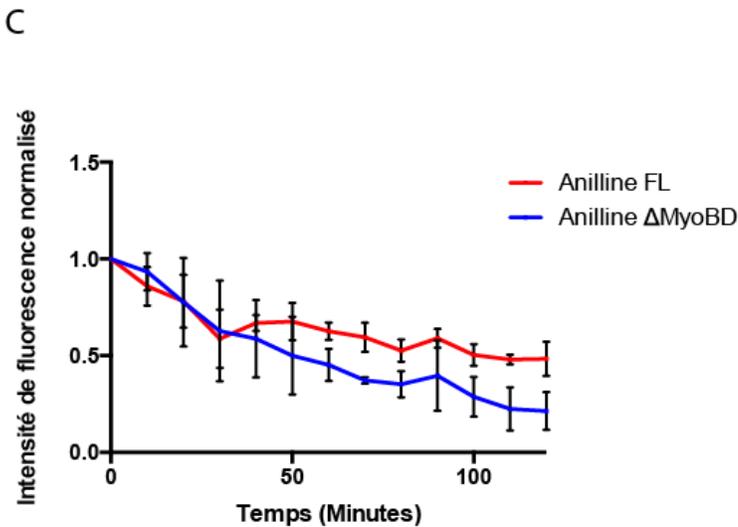


Figure 19 : L'anilline Δ MyoBD est moins bien retenue à l'AM que l'anilline FL.

(A) Images d'une séquence de time-lapse montrant le recrutement d l'anilline-FL-GFP (haut) et de l'anilline- Δ MyoBD-mCherry (bas) ainsi qu'un exemple de régions d'intérêts dessinées manuellement et dont le volume reste constant pour les deux constructions à travers le temps. Projection de 11 z (1 μ m par tranche), objectif 63x. La barre représente 5 μ m. (B) Formule montrant le calcul des intensités de fluorescence de l'AM. $\sum M_t$: sommes des intensités de fluorescence dans la région d'intérêt rouge (M) recouvrant l'AM à un temps t, $\sum B_t$: sommes des intensités de fluorescence dans la région d'intérêt bleue (B) recouvrant le bruit de fond à un temps t, $\sum M_{t=0}$: sommes des intensités de fluorescence dans la région d'intérêt M au temps t=0, $\sum B_{t=0}$: sommes des intensités de fluorescence dans la région d'intérêt B au temps t=0, t=0 : temps représentant la fermeture de l'AC et l'apparition de l'AM immature. (C) Quantification de

l'intensité de fluorescence normalisée dans la région d'intérêt pour les deux constructions à travers le temps. Anilline FL-GFP (n=2, N=18), anilline Δ MyoBD-mCherry (n=2, N=20).

Nos résultats précédents montrent que l'anilline Δ MyoBD produit des AM, en définitive moins volumineux, et dont le volume diminue plus, au fur et à mesure de leur maturation, que ceux produits par l'anilline FL. Pour déterminer si cette baisse de volume est due réellement à une moindre rétention de l'anilline ou si ce n'est qu'une conséquence d'un changement structural de l'AM, une expérience de co-expression d'anilline FL-GFP et d'anilline Δ MyoBD-mCherry a été effectuée (Figure 19A). La co-expression des deux constructions nous permet de comparer la rétention de l'anilline mutante à celle de l'anilline FL (Type sauvage). L'équation en (Figure 19B) nous permet de relativiser les valeurs de somme d'intensité de fluorescence pour chaque construction par rapport à leur intensité initial à temps zéro, qui représente la fermeture de l'AC et sa transition vers l'AM. Ainsi, la somme de l'intensité de fluorescence normalisée de l'anilline Δ MyoBD-GFP diminue plus rapidement que celle de l'anilline-GFP (FL) exprimée dans la même cellule, et au bout de 2 h donne un AM mature qui est relativement moins fluorescent (Figure 19C). Ceci suggérant un rôle du MyoBD dans la rétention de l'anilline à l'AM. On note que les deux courbes se chevauchent jusqu'à la 30ème minute, et ensuite se séparent, indiquant possiblement un moment critique où le MyoBD entre en jeu.

4.2 Étude de l'interdépendance du MyoBD de l'anilline avec la myosine-II

4.2.1 Le recrutement du MyoBD au sillon de clivage est dépendant du motif WEDD

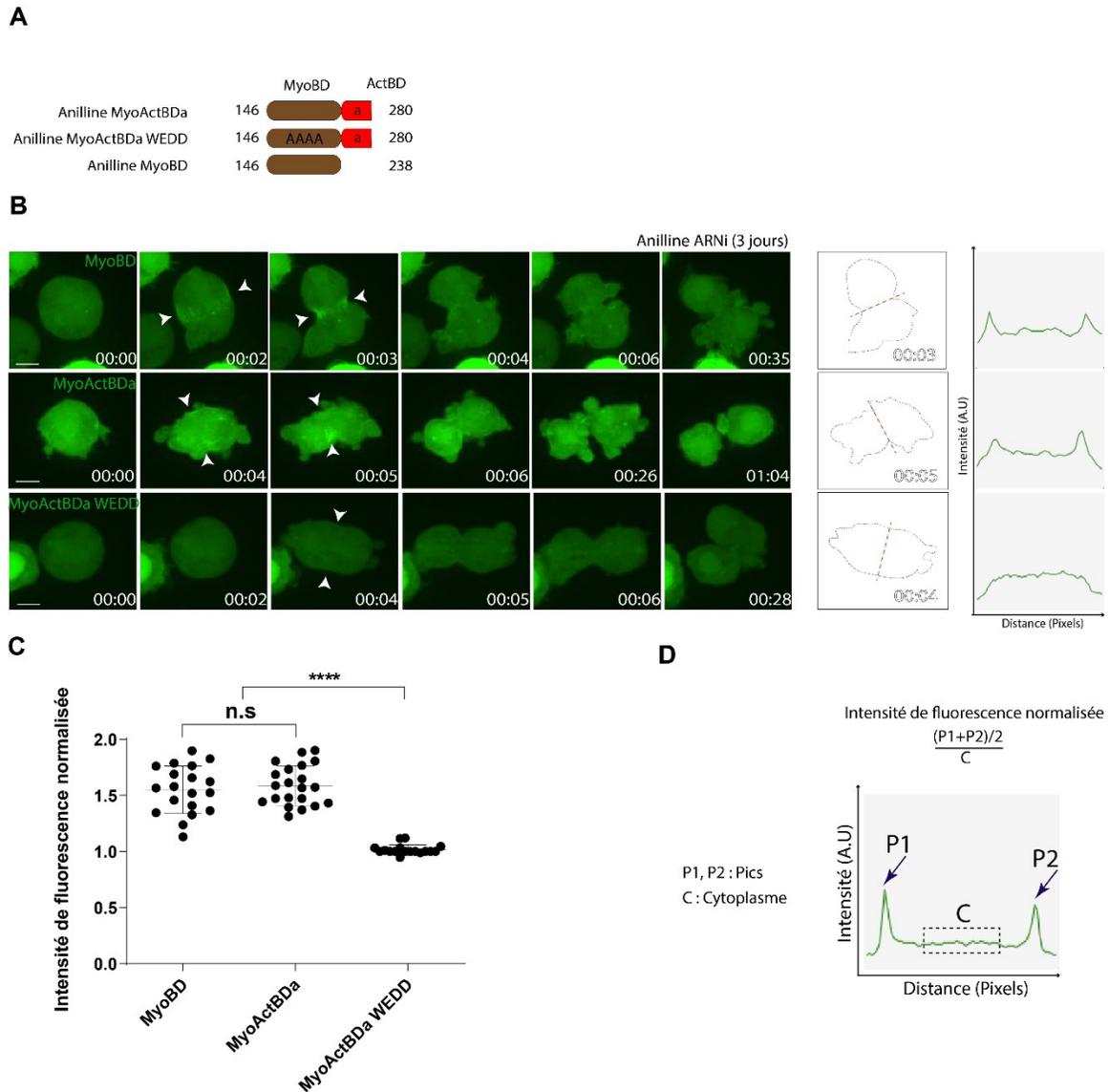


Figure 20 : Le MyoBD est recruté de manière transitoire au sillon de clivage mais pas le mutant WEDD.

(A) Représentation schématique de l'anilline MyoActBDa, le domaine MyoBD ainsi qu'un site de liaison à l'actine adjacent (ActBDa) (146-280), anilline MyoActBDa WEDD, une mutation du motif WEDD à AAAA de anilline MyoActBDa (146-280) et l'anilline MyoBD (146-238). (B) Images d'une séquence de time-lapse montrant le recrutement des 3 constructions en (A) durant la cytokinèse, suite à la déplétion de l'anilline endogène par ARNi (3 jours). Les flèches blanches indiquent la position du sillon de clivage, les illustrations et graphiques à droite indiquent le temps et la position du profil de ligne (line profile) servant à calculer les intensités de fluorescence le long de

cette ligne. Projection de 11 z (1 μm par tranche), objectif 63x. La barre représente 5 μm . (C) Quantifications du recrutement de l'anilline MyoActBDa ($n=3$, $N=21$), MyoActBDa WEDD ($N=3$, $n=17$) et MyoBD ($N=3$, $n=19$). Chaque point représente une cellule. Les moyennes \pm les écart-types sont illustrés; * $p<0,05$, ** $p<0,01$, **** $p<0,0001$ et ns = non-significatif pour un test statistique post-hoc de Games-Howell. (D) Schéma et équation montrant le calcul de l'intensité de fluorescence normalisée. P1 et P2 représentent la fluorescence aux pics normalisés par l'intensité de fluorescence du cytoplasme.

Il a été démontré que le motif conservé WEDD est nécessaire pour le bon fonctionnement du MyoBD puisque dans l'expérience de sauvetage de la cytokinèse, l'anilline Δ MyoBD et l'anilline WEDD ont produits des phénotypes similaires en termes de sauvetage de la cytokinèse (Figure 16C). Dans cette même optique, il était important de vérifier si la mutation WEDD à AAAA pouvait inhiber un éventuel recrutement du MyoBD au cortex. L'expression du MyoActBDa-GFP et MyoActBDa WEDD-GFP nous a permis de répondre à ce questionnement (Figure 20A). En effet, le MyoBD-GFP et le MyoActBDa-GFP sont tous deux recrutés transitoirement pendant 2 minutes au sillon de clivage (Figure 20B). Cependant, la mutation WEDD à AAAA du MyoActBDa a inhibé son recrutement dans 100% des cas (Figure 20C). Ces résultats indiquent que le motif WEDD du MyoBD est nécessaire pour le recrutement de ce dernier.

Il est à noter que l'anilline MyoBD et l'anilline MyoActBDa ont un comportement très similaire durant la cytokinèse mais leurs localisations diffèrent en interphase (Figure 32). Le MyoBD est complètement diffus en interphase alors que le MyoActBDa est partiellement nucléaire. Ceci pourrait être expliqué par un NLS dans cette région du ActBDa (241-246). Bien que le NLS principale pour la localisation nucléaire de l'anilline de drosophile se trouve dans la région centrale, ce NLS dans la région ActBD-A pourrait y contribuer.

4.2.2 Le recrutement du MyoBD au sillon de clivage est dépendant de la myosine

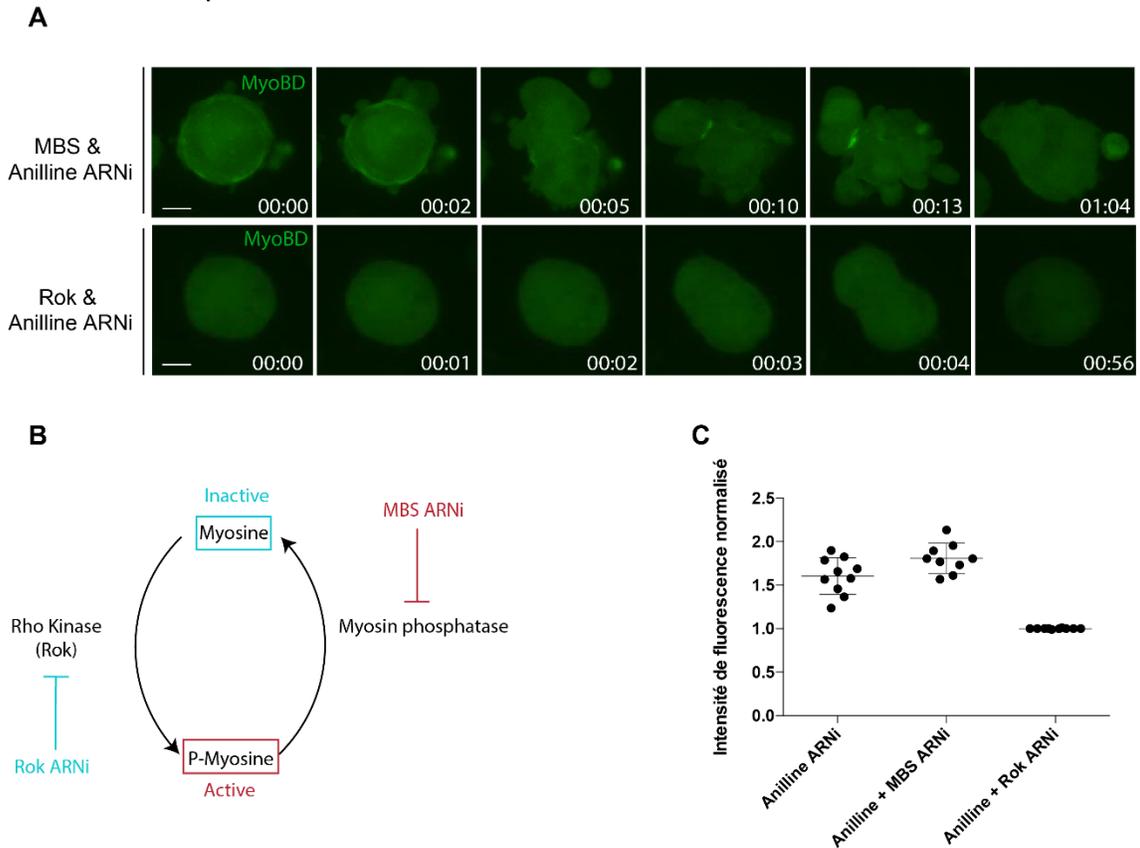


Figure 21 : Le recrutement du MyoBD au sillon de clivage suit le statut de l'activation de la myosine II

(A) Images d'une séquence de time-lapse montrant le recrutement du MyoBD de l'anilline durant la cytokinèse suite à la déplétion de l'anilline endogène et Rok ou MBS. ARNi durant 5 jours. Projection de 11 z (1 μm par tranche), objectif 63x. La barre représente 5 μm . (B) Schéma montrant l'activité des ARNi utilisés sur les niveaux d'activation de la Myosine. MBS ARNi (Myosin Binding Subunit de la phosphatase de la myosine). Rok ARNi (Rho kinase). (C) Quantification du recrutement du MyoBD au cortex dans différentes conditions. Anilline ARNi (n=1, N=10), Anilline + MBS ARNi (n=1, N=10) et Anilline + Rok ARNi (n=1, N=10). Chaque point représente une cellule.

Nos résultats précédents montrent que le MyoBD est recruté au sillon de clivage d'une manière transitoire de façon dépendante du motif WEDD. Pour déterminer si ce recrutement transitoire est dépendant de la myosine-II, les niveaux d'activation de MRLC^{Sqh} ont été modifiés artificiellement avec Rok ARNi et MBS ARNi (Figure 21B). MBS ARNi cible la sous-unité de liaison à la myosine de la myosine phosphatase empêchant la

déphosphorylation et l'inactivation de la myosine-II. Rok ARNi cible Rho kinase Rok empêchant la phosphorylation et l'activation de la myosine

En concordance avec la littérature suggérant une interaction MyoBD/Myosine-II (Straight et al., 2005), la suractivation de la myosine-II a permis de recruter plus de MyoBD (Figure 21C), et a aussi permis de prolonger sa durée de recrutement (Figure 21A). De plus, après traitement au MBS ARNi, il était maintenant possible de voir un recrutement cortical du MyoBD en métaphase. Au contraire, l'inactivation de la myosine a complètement inhibé le recrutement du MyoBD au cortex d'une manière similaire à la mutation WEDD à AAAA (Figure 21A et 21B). Ces résultats suggèrent que le MyoBD de l'anilline est recruté de manière transitoire au sillon de clivage grâce au motif WEDD et à la myosine-II.

4.2.3 Les structures LatA comme moyen pour étudier l'interdépendance du MyoBD de l'anilline avec la myosine

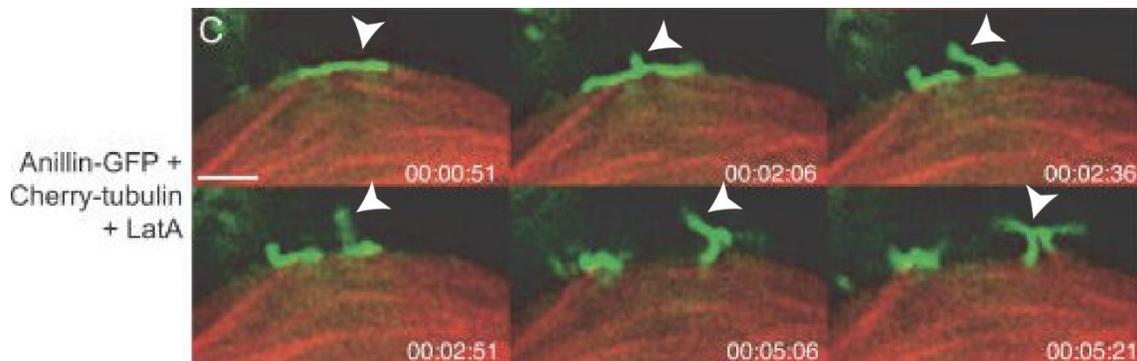


Figure 22 : Structures LatA formées par l'anilline.

Images d'une séquence de time-lapse de cellules S2 coexprimant l'anilline-GFP et la mcherry-tubulline progressant en anaphase en présence de 1 µg/ml de LatA (Latrunculin A). Adapté de (Hickson & O'Farrell, 2008)

Le MyoBD pourrait contenir un site de liaison à l'actine (Jananji et al., 2017). Afin d'éliminer la possibilité de médiation de l'actine dans le recrutement du MyoBD dépendant de la myosine-II, nous avons examiné leur recrutement aux structures LatA. Les structures LatA sont des structures formées par Rho1, l'anilline et les septines dans

une cellule qui tente la division après un traitement à la Latrunculin A (Hickson & O'Farrell, 2008). Cette drogue permet la dépolymérisation de l'actine déstabilisant le cortex cellulaire, où beaucoup des protéines activées par Rho et recrutées le long des filaments d'actine s'agglomèrent en des structures LatA. Les structures LatA peuvent se former indépendamment des microtubules mais s'y attachent ensuite quand présents (Figure 22). Elles adoptent une forme tubulaire filamenteuse typique des septines et de l'anilline. Leur formation est dépendante des septines, de l'anilline et de Rho, de sorte que la déplétion d'une seule de ces trois protéines inhibe leur formation. Cependant, y sont recrutées d'autres protéines dispensables pour leur formation comme la myosine-II, Diaphanous (Hickson & O'Farrell, 2008). Un autre point important sur les structures LatA c'est qu'elles deviennent enveloppées de membrane plasmique et apparaissent comme dépassant de la cellule. Pour des raisons de clarté, ces structures LatA qui dépassent de la cellule seront dorénavant appelées des « structures LatA protubérantes ».

4.2.3.1 Le MyoBD et la myosine-II sont recrutés à des structures LatA différentes dépendamment de la présence ou l'absence de l'anilline endogène.

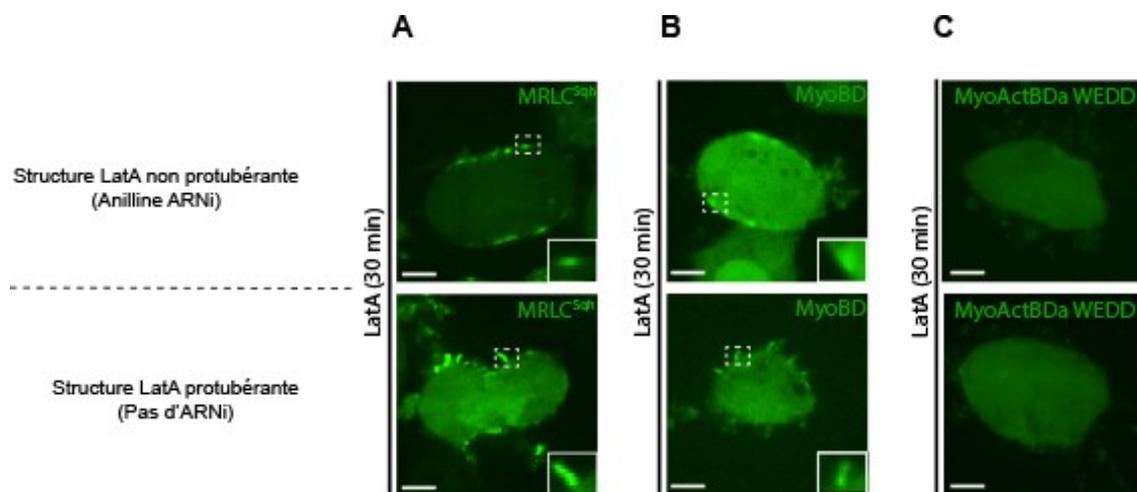


Figure 23 : Le MyoBD « suit » la myosine-II (MRLC^{5qh}) de façon dépendante du motif WEDD.
 (A) Image d'une séquence de time-lapse montrant le recrutement de MRLC^{5qh} aux structures LatA protubérantes (bas) et non protubérante (haut, déplétion de l'anilline endogène) 6 minutes post-anaphase. (B) Image d'une séquence de time-lapse montrant le recrutement du MyoBD aux structures LatA protubérantes (bas) et non protubérante (haut) 6 minutes post-anaphase. (C)

Image d'une séquence de time-lapse montrant le recrutement du mutant MyoActBDa WEDD aux structures LatA protubérantes (bas) et non protubérante (haut) 6 minutes post-anaphase. Les cellules S2 ont été traitées au LatA 1 µg/ml (30 minutes). Projection de 11 z (1 µm par tranche), objectif 63x. La barre représente 5 µm.

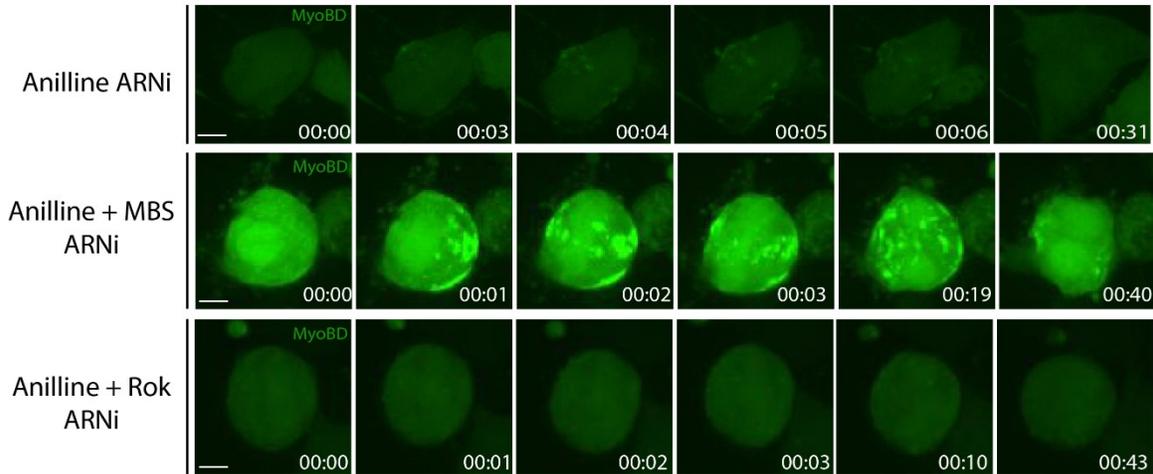
En présence d'anilline endogène et de LatA, MRCL^{Sqh} est recrutée aux structures LatA protubérantes. Cependant, quand l'anilline endogène est réprimée par ARNi, MRCL^{Sqh} se retrouve recrutée à d'autres structures LatA, cette fois-ci non protubérantes. Ces dernières apparaissent comme intracellulaires, non filamenteuses et prennent la forme de simples agglomérats sans structure précise (Figure 23A). Cette particularité de la myosine-II d'être recrutée à des structures LatA différentes selon la présence ou l'absence d'anilline nous permet d'examiner en profondeur l'interdépendance entre le MyoBD de l'anilline et la myosine-II. Pour ce faire, nous avons d'abord fait exprimer le MyoBD en présence de l'anilline endogène afin de vérifier si l'on pouvait voir un recrutement aux structures LatA protubérantes (Figure 23B). Effectivement, Le MyoBD est légèrement recruté aux structures LatA protubérantes, similaires à celles formées par l'anilline mais seulement dans un petit pourcentage de cellules (30%).

Nous avons démontré que la MRCL^{Sqh} et le MyoBD étaient recrutés aux structures LatA protubérantes en présence d'anilline endogène. Pour vérifier si le MyoBD pouvait "suivre" MRCL^{Sqh} dans les structures LatA non protubérantes, nous avons transfecté le MyoBD dans des conditions où l'anilline endogène a été réprimé par ARNi (Figure 23B). Conformément à notre hypothèse, le MyoBD a bien été recruté aux structures LatA non protubérantes en absence d'anilline endogène, de manière similaire à la MRCL^{Sqh}.

Finalement, pour tester si ce recrutement du MyoBD était dépendant du motif WEDD. Nous avons fait exprimer le mutant MyoActBDa-WEDD dans les mêmes conditions (Figure 23C). Le MyoActBDa-WEDD n'a été recruté à aucune structure LatA suggérant que le MyoBD « suit » la Myosine (MRLC^{Sqh}) grâce au motif WEDD. Il est à noter que l'anilline MyoBD et l'anilline MyoActBDa-WT sont recrutés aux cortex et aux structures LatA de manière identique (Résultats non publiés).

4.2.3.2 Le niveau d'activation de la Myosine affecte le recrutement du MyoBD aux structures LatA non protubérantes

A



B

Recrutement du MyoBD aux structures LatA non protubérantes

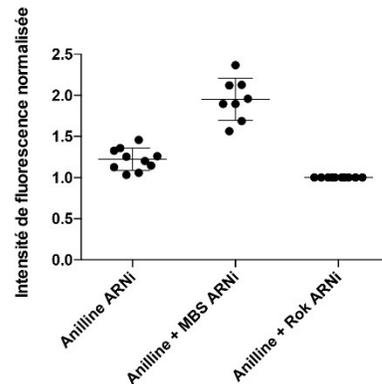


Figure 24 : Les niveaux d'activation de la myosine-II affectent le recrutement du MyoBD aux structures LatA non protubérantes.

(A) Images d'une séquence de time-lapse montrant le recrutement du MyoBD aux structures LatA non protubérantes, après déplétion de l'anilline, de l'anilline + MBS et de l'anilline + Rok, durant la cytokinèse. ARNi (5 jours), 1 µg/ml de LatA (30 minutes). Projection de 11 z (1 µm par tranche), objectif 63x. La barre représente 5 µm. (B) Quantifications du recrutement du MyoBD aux structures LatA non protubérantes. Anilline ARNi (n=1, N=10), anilline + MBS ARNi (n=1, N=8), anilline + Rok ARNi (n=1, N=10). La normalisation a été faite par rapport à l'intensité de fluorescence du cytoplasme. Chaque point représente une cellule.

Jusqu'à présent, nos résultats ont montré que le MyoBD était recruté avec MRLC^{Sqh} aux structures LatA protubérantes en présence d'anilline endogène. En absence d'anilline endogène, le MyoBD et MRLC^{Sqh} sont recrutés aux structures LatA non

protubérantes. Nous voulions donc vérifier si l'on était capable d'inhiber ou d'amplifier le recrutement du MyoBD aux structures LatA non protubérantes en modifiant artificiellement les niveaux d'activation de la myosine-II avec MBS ARNi ou Rok ARNi. Le choix des structures LatA non protubérantes a été fait pour éviter toute perturbation ou compétition de la part de l'anilline endogène. L'expression du MyoBD a montré qu'il était bien recruté aux structures LatA non protubérantes, et que la suractivation de la myosine (MBS ARNi) a amplifié ce recrutement alors que l'inactivation de la myosine (Rok ARNi) l'a inhibé (Figure 24A et 24B). Ensemble, ces données démontrent que le MyoBD est recruté au cortex équatorial, indépendamment de l'actine, et d'une manière dépendante de la myosine-II activée et du motif WEDD.

4.2.3.3 La colocalisation de l'anilline et de la myosine-II aux structures LatA dépend du MyoBD

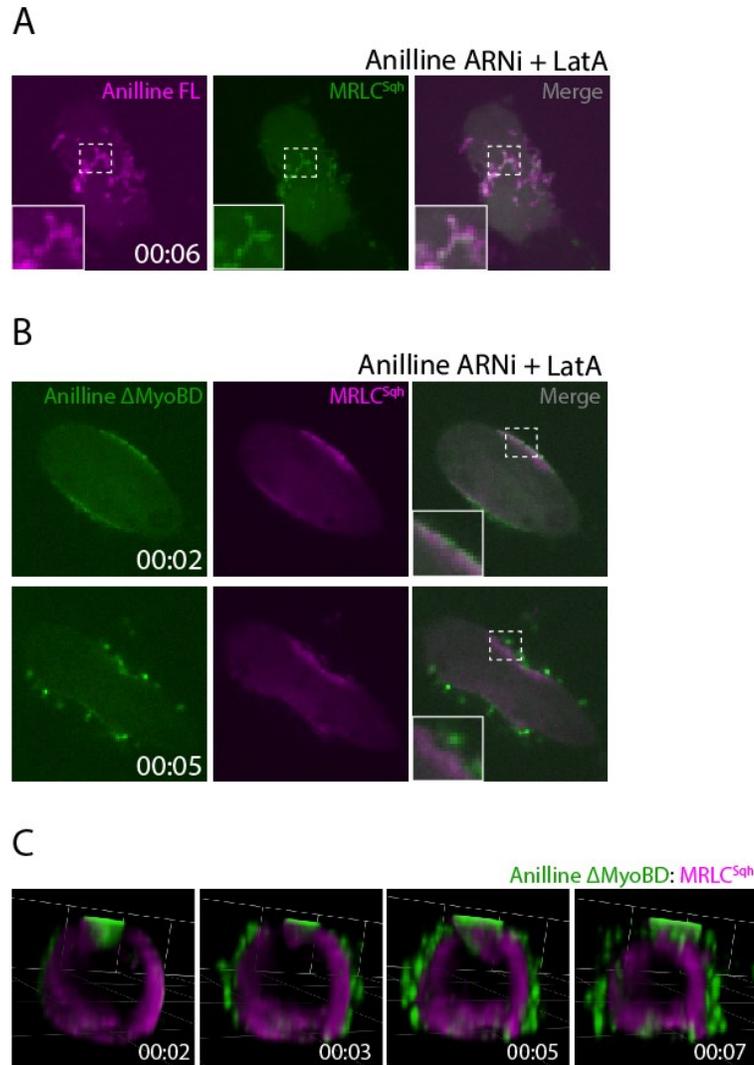


Figure 25 : MRLC^{5qh} est recrutée aux structures LatA protubérantes grâce au MyoBD de l'anilline. (A) Image d'une séquence de time-lapse montrant le recrutement de l'anilline FL-mCherry co-exprimé avec MRLC^{5qh}-GFP aux structures LatA 6 minutes post-anaphase. Projection de 11 z (1 μ m par tranche), objectif 63x. La barre représente 5 μ m. ARNi 3 jours (B) Image d'une séquence de time-lapse montrant le recrutement de l'anilline Δ MyoBD-GFP co-exprimé avec MRLC^{5qh}-mCherry aux structures LatA 2 et 5 minutes post-anaphase. Projection de 1 z (1 μ m par tranche), objectif 63x. La barre représente 5 μ m. ARNi 3 jours. (C) reconstruction 3D de la cellule en (B) réalisée à l'aide de Volocity 6.3 à plusieurs moments post-anaphase.

Jusqu'à présent, nos résultats ont démontré que le MyoBD de l'anilline et la MRLC^{5qh} pouvaient être recrutés séparément aux structures LatA protubérantes et non

protubérantes dépendamment de la présence ou l'absence d'anilline endogène. Puisque nos précédents résultats, en concordance avec le travail de (Straight et al., 2005), suggèrent fortement une interaction MyoBD/Myosine-II, nous avons émis l'hypothèse que le MyoBD de l'anilline est l'élément qui permettait à la MRCL^{Sqh} d'être recrutée aux structures LatA protubérantes.

Pour tester cette hypothèse, nous avons d'abord voulu montrer qu'en temps normal, la MRCL^{Sqh} et l'anilline pouvaient colocaliser dans les structures LatA protubérantes. En coexprimant l'anilline-FL-mCherry et MRCL^{Sqh}-GFP, on peut observer une colocalisation de ces deux constructions dans les structures LatA protubérantes à 6 minutes post-anaphase, suite au traitement avec LatA de 30 minutes (Figure 25A).

Ensuite, pour tester si le MyoBD de l'anilline était requis pour le recrutement de MRCL^{Sqh} aux structures LatA protubérantes, l'anilline Δ MyoBD-GFP et MRCL^{Sqh}-mCherry ont été coexprimées dans un contexte où l'anilline endogène a été réprimée par ARNi (Figure 25B). À 2 minutes post-anaphase, on observe déjà un début de séparation de l'anilline- Δ MyoBD-GFP et MRCL^{Sqh}-mCherry, mais les structures LatA ne sont pas encore formées. À 5 minutes post-anaphase, on observe que l'anilline- Δ MyoBD-GFP a formé des structures LatA protubérantes alors que MRCL^{Sqh}-mCherry est restée à la membrane non protubérante (Figure 25B). Cette séparation, entre l'anilline Δ MyoBD et MRCL^{Sqh}, est encore plus claire dans la reconstruction 3D de la même cellule effectuée dans Volocity (Figure 25C). Dans cette reconstruction 3D, on observe que l'anilline Δ MyoBD-GFP et MRCL^{Sqh}-mCherry colocalisent initialement à 1 minute post-anaphase pour se séparer ensuite à 3, 5 et 7 minutes post-anaphase. Ces résultats montrent que la localisation de MRCL^{Sqh} aux structures LatA protubérantes est dépendante du MyoBD de l'anilline, sans lequel, MRCL^{Sqh} se localise dans les structures LatA non protubérantes.

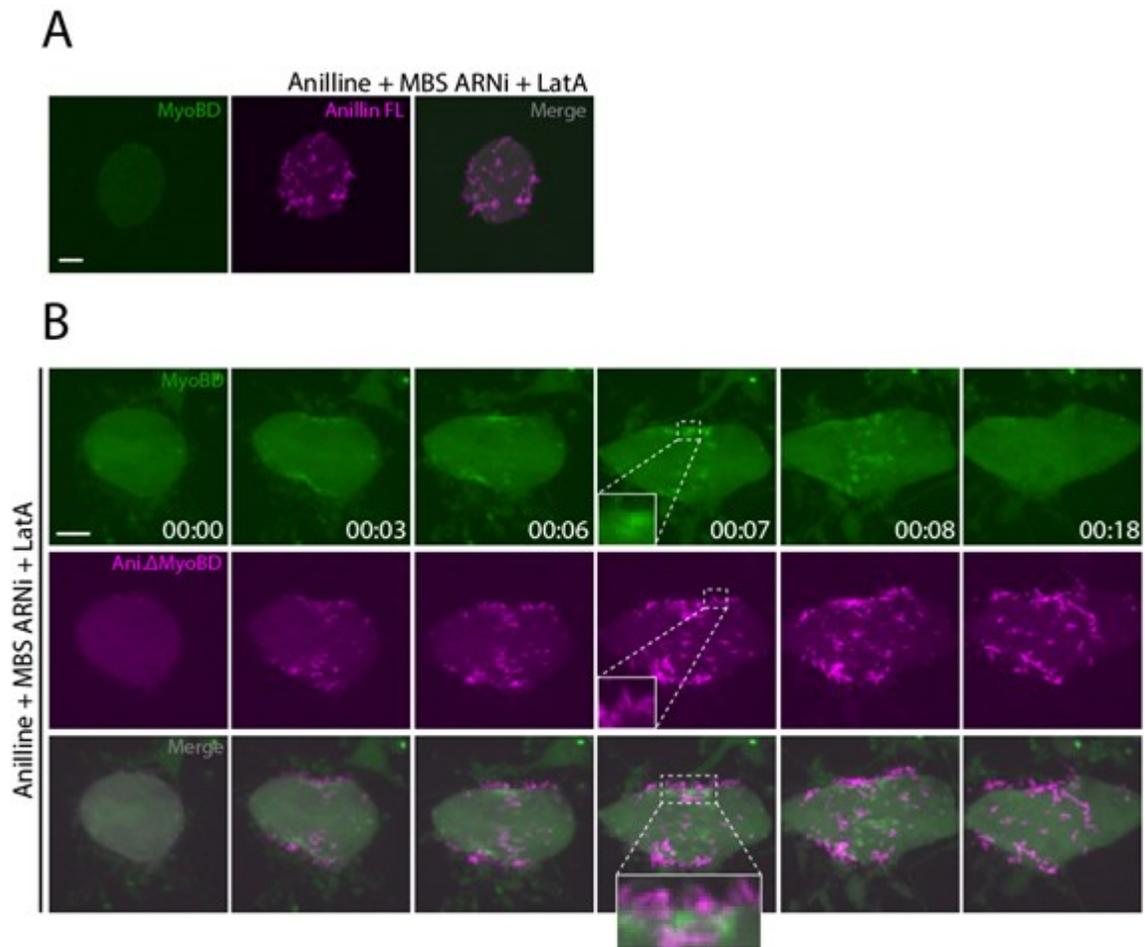


Figure 26 : Le recrutement du MyoBD à la membrane équatoriale est empêché par la surexpression de l'anilline, mais pas par la surexpression de l'anilline- Δ MyoBD.

(A) Image d'une séquence de time-lapse montrant le recrutement de l'anilline FL-mCherry co-exprimé avec MyoBD-GFP aux structures Lata 8 minutes post-anaphase. Projection de 11 z confocaux (1 μ m par tranche), objectif 63x. La barre représente 5 μ m. ARNi 5 jours. (B) Images d'une séquence de time-lapse montrant le recrutement de l'anilline Δ MyoBD-mCherry co-exprimé avec MyoBD-GFP aux structures Lata durant la cytokinèse. Projection de 11 z confocaux (1 μ m par tranche), objectif 63x. La barre représente 5 μ m. Anilline et MBS ARNi, 5 jours. Pour mettre en évidence les structures Lata, les cellules ont été traité avec 1 μ g/ml de Lata (30 minutes).

Jusqu'à présent, nos résultats ont montré que le MyoBD de l'anilline dépend de P-MRLC^{Sqh} pour être recruté aux structures Lata protubérantes et non protubérantes. De plus, MRLC^{Sqh} dépend du MyoBD de l'anilline pour être recruté aux structures Lata protubérantes. Ceci démontre l'interdépendance entre P-MRLC^{Sqh} et le MyoBD en termes de recrutement. Dans cette même optique, comme pour MRLC^{Sqh}, nous voulions tester si le MyoBD seul pouvait être recruté aux structures Lata non protubérantes en présence

de structures LatA protubérantes formées par l'anilline- Δ MyoBD. La co-expression de l'anilline- Δ MyoBD-mCherry et le MyoBD-GFP a montré que le MyoBD-GFP était plutôt recruté aux structures LatA non protubérantes identiques à celles formées par MRLC^{Sqh}, même si l'anilline- Δ MyoBD-mCherry formait des structures LatA protubérantes (Figure 26B). Toutefois, lorsque coexprimé avec l'Anilline FL, le MyoBD n'était recruté nulle part suggérant une possible compétition entre ces deux constructions (Figure 26A). L'utilisation du MBS ARNi est dû au fait qu'il nous était difficile de voir un recrutement clair avec des niveaux de base d'activation de la myosine-II. Ensemble, ces données indiquent un fort niveau de dépendance MyoBD/P-MRLC^{Sqh}.

4.3 Le MyoBD augmente le temps de résidence corticale de la partie N-terminale de l'Anilline, de façon dépendante du NTD adjacent.

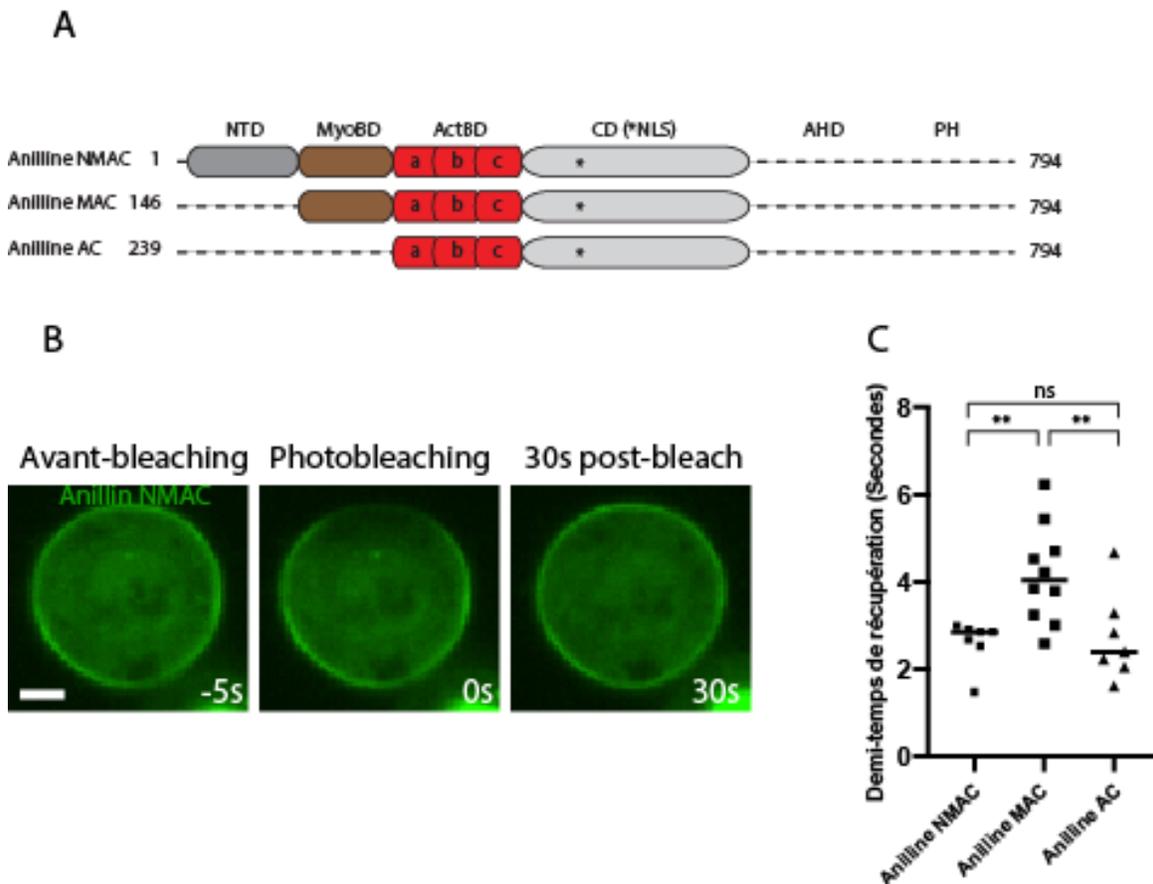


Figure 27 : Le NTD inhibe la rétention de l'anilline dépendante du MyoBD au cortex.

(A) Représentation schématique de l'anilline NMAC (NTD-MyoBD-ActBD-CD) (1-794), MAC (MyoBD-ActBD-CD) (146-794) et AC (ActBD-CD) (414-794). (B) Images d'une séquence de time-lapse montrant le recrutement de l'anilline NMAC-GFP au cortex, lors de la cytokinèse suite à la déplétion de l'anilline endogène (3 jours), 5 minutes avant le blanchiment (bleaching), durant et 30 secondes post-bleaching (post-blanchiment). (C) Demi-temps de récupération post-bleaching de l'anilline NMAC, MAC et AC. Les moyennes \pm les écart-types sont illustrés; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ et ns = non-significatif pour un test statistique post-hoc de Games-Howell.

Nos résultats ont montré que le MyoBD participait à la rétention de l'anilline à l'AM durant la cytokinèse (Figure 16, 18). Pour vérifier d'une autre façon ces observations, un essai FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) a été effectué. Dans cet essai, les constructions NMAC (NTD-MyoBD-ActBD-CD), MAC (MyoBD-ActBD-CD) et AC (ActBD-CD) ont été exprimées séparément suivant la déplétion de l'anilline endogène (Figure 27A). Après un recrutement au cortex en métaphase, une petite région corticale a été blanchie au laser, et la récupération de fluorescence de cette même région a été mesuré sur 30 secondes pour les trois constructions (Figure 27B). Le demi-temps de récupération va nous permettre de comparer la vitesse à laquelle chaque construction récupère la moitié de son intensité de fluorescence initiale, et donc de comparer leur mobilité. L'anilline NMAC et AC affichent un demi-temps de récupération presque deux fois plus long que l'anilline MAC (Figure 27C). Premièrement, ce résultat indique que le MyoBD participe à la rétention de l'anilline au cortex. Deuxièmement, cela indique aussi que le NTD semble inhiber la contribution observée du MyoBD dans la rétention de l'anilline.

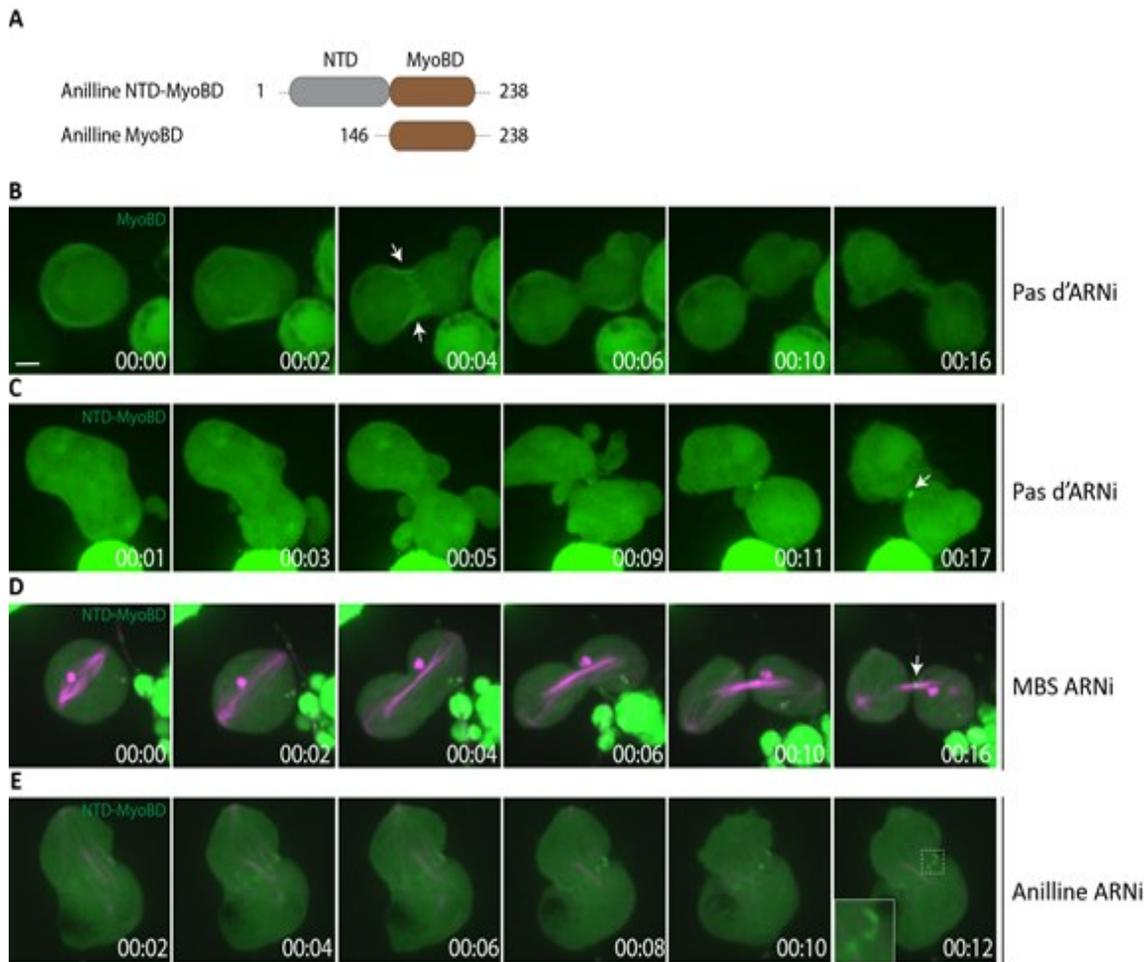


Figure 28 : Le recrutement du MyoBD au sillon de clivage est inhibé par la présence du NTD.

(A) Représentation schématique de l'anilline NTD-MyoBD (1-238) et de l'anilline MyoBD (146-238). (B) Images d'une séquence de time-lapse montrant le recrutement du MyoBD co-exprimé avec mCherry-tubulline, lors de la cytokinèse après trois jours d'anilline ARNi. Les flèches blanches montrent le recrutement au sillon de clivage. (C-E) Images d'une séquence de time-lapse montrant le recrutement du NTD-MyoBD co-exprimé avec mCherry-tubulline, lors de la cytokinèse en présence d'anilline endogène. Les flèches blanches montrent le recrutement à l'AM. (C), après 4 jours de MBS ARNi (D), ou après trois jours d'anilline ARNi (E). Projection d'intensité maximale de 11 z confocaux (1 μ m par tranche). Les barres d'erreur correspondent à 5 μ m.

Après avoir démontré que le NTD avait une action inhibitrice sur la rétention dépendante du MyoBD dans l'essai FRAP, nous voulions vérifier si le NTD pouvait inhiber le recrutement transitoire du MyoBD au sillon de clivage observé lors de la cytokinèse. Pour ce faire, les constructions NTD-MyoBD-GFP et MyoBD-GFP ont été exprimées séparément dans des cellules S2 (Figure 28A). En présence d'anilline endogène, l'expression du MyoBD-GFP nous permet de voir un recrutement au sillon de clivage

(flèches blanches) (Figure 28B). Cependant, ce recrutement est inhibé lorsque le MyoBD est exprimé avec le NTD (NTD-MyoBD-GFP). À la place, le NTD-MyoBD est recruté plus tard à l'AM (flèche blanche) d'une manière similaire au recrutement du NTD seul (résultats non publiés de Sabrya Carim) (Figure 28C). De plus, la suractivation de la myosine-II par traitement au MBS ARNi (5 jours) n'a pas affecté le recrutement du NTD-MyoBD-GFP (Figure 28D). L'expression du NTD-MyoBD suite à la déplétion de l'anilline endogène montre que ce dernier est recruté au sillon de clivage, mais pas de façon similaire au MyoBD. Le NTD-MyoBD est recruté le long d'une fine ligne discontinue faisant le tour de l'équateur cellulaire, probablement représentant les aires ou les microtubules et citron kinase touchent le cortex (Figure 28E, encadré). Ces résultats suggèrent que le NTD inhibe le recrutement du MyoBD au sillon de clivage durant la cytokinèse.

4.4 Test de l'interaction MyoBD/Myosine-II

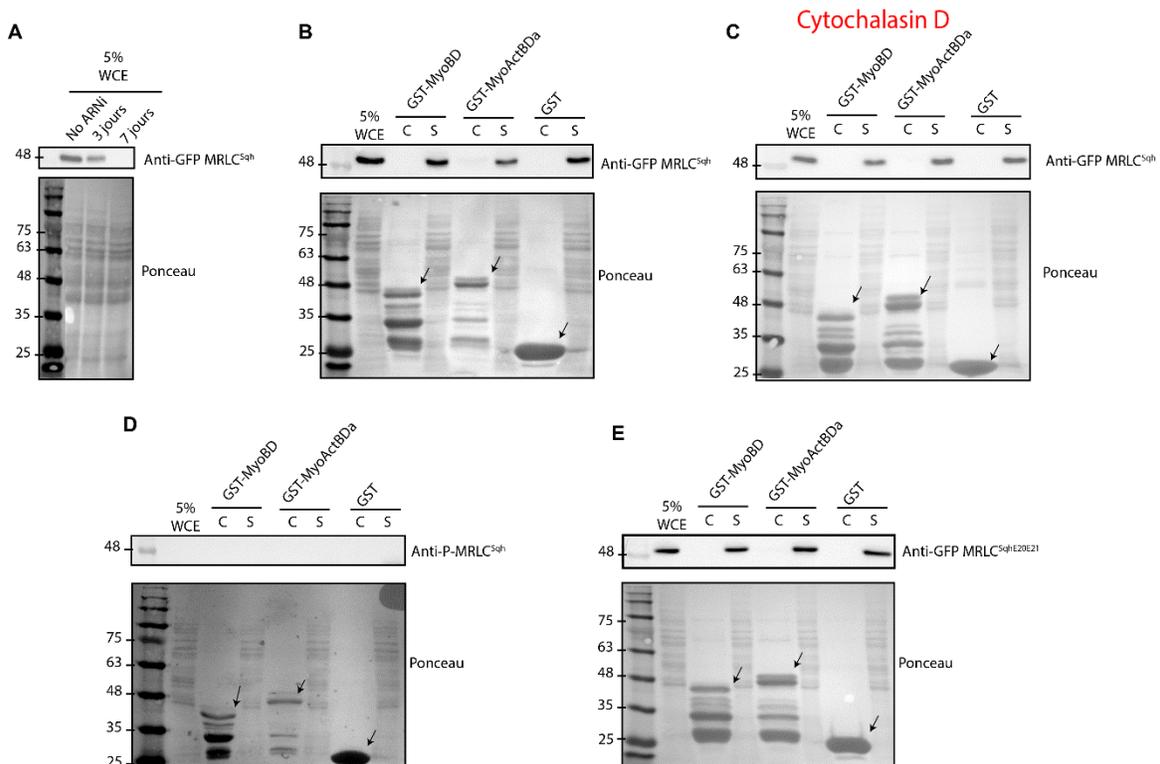


Figure 29 : le MyoBD n'a pas réussi à extraire MRLC^{Sqh} du lysat cellulaire.

(A) Western blot de lysats (WCE) d'une lignée de cellules S2 exprimant de manière stable MRCL^{Sqh}-GFP, sans ARNi, après 3 jours et 7 jours de MRLC^{Sqh} ARNdb. Bas Ponceau, Haut Anti-GFP-MRCL^{Sqh} blot (B) Expériences d'extraction de GST dans laquelle GST-Anilline-MyoBD, GST-Anilline-

MyoActBDa et GST ont été utilisé pour extraire MRCL^{Sqh}-GFP de la lignée S2 en (A). Bas Ponceau, Haut Anti-GFP blot. (C) Expériences d'extraction de GST dans laquelle GST-Anilline-MyoBD, GST-Anilline-MyoActBDa et GST ont été utilisés pour extraire MRCL^{Sqh} de la lignée S2 en (A) traitée 1h à la cytochalasin D. Bas Ponceau, Haut Anti-GFP blot. (D) Expériences d'extraction de GST dans laquelle GST-Anilline-MyoBD, GST-Anilline-MyoActBDa et GST ont été utilisés pour extraire MRCL^{Sqh} de la lignée S2 en (A). Bas Ponceau, Haut Anti-Phospho-MRCL^{Sqh} blot. (E) Expériences d'extraction de GST dans laquelle GST-Anilline-MyoBD, GST-Anilline-MyoActBDa et GST ont été utilisés pour extraire MRCL^{Sqh} d'une lignée S2 exprimant de manière stable MRCL^{SqhE20E21}-GFP. Bas Ponceau, Haut Anti-GFP-MRCL^{Sqh} blot. Les fractions de lysats (5% WCE), de pull-down ou culot (C) et les surnageants (S) ont été séparés par SDS-PAGE, transférés sur des membranes et immunomarquées avec l'anticorps respectif (A-E). Les flèches noires indiquent les bandes correspondantes à la taille de migration prédite des constructions respectives.

Jusqu'à présent, nos résultats de dépendance de recrutement entre le MyoBD de l'anilline et MRCL^{Sqh} n'ont pas contredit l'interaction MyoBD/Myosine-II découverte chez *Xenopus* (Straight et al., 2005). Cependant, cette interaction n'a jamais été testée chez la drosophile ou dans aucun autre système. Nous ne savons donc pas si cette interaction est conservée.

Pour tester la conservation de cette interaction, un essai pull down a été effectué. Afin de s'assurer de la présence de la bande MRCL^{Sqh}-GFP, un Western blot de lysats de la lignée S2 MRCL^{Sqh}-GFP a été effectué avec un anticorps Anti-GFP. D'abord sans ARNi, ensuite après 3 jours et 7 jours d'ARNi contre MRCL^{Sqh} (Figure 29A). On observe l'apparition d'une bande autour de 48 kDa correspondant à la taille prédite de MRCL^{Sqh}-GFP. Cette bande disparaît graduellement après 3 jours de MRCL^{Sqh} ARNi et ensuite complètement au bout de 7 jours. Pour tester l'interaction entre MyoBD de l'anilline et MRCL^{Sqh} chez la drosophile, nous avons effectué plusieurs séries d'expériences de pull down utilisant GST-Anilline-MyoBD, GST-Anilline-MyoActBDa et GST pour extraire MRCL^{Sqh}-GFP ou MRCL^{SqhE20E21}-GFP (mutant phosphomimique de MRCL^{Sqh}) de lysats de lignées S2 exprimant de manière stable les deux constructions respectives (Figure 29B-E). En présence d'actine F, alors que MRCL^{Sqh}-GFP a été détectée dans le lysat (WCE) et les Surnageants (S) de GST-Anilline-MyoBD, GST-Anilline-MyoActBDa et GST, aucune bande MRCL^{Sqh} n'est apparue dans les culots (C) respectifs (Figure 29B). Le même résultat a été obtenu en absence d'actine F (2 µg/ml de cytochalasine D) (Figure 29C). N'ayant pas obtenu de bande positive pour MRCL^{Sqh}-GFP dans les culots, nous nous sommes demandé

si la bande MRLC^{Sqh}-GFP dans les lysats contenait de la myosine activée (P-MRLC^{Sqh}). Le MyoBD étant supposé se lier exclusivement aux P-MRLC^{Sqh}, nous avons répété l'expérience pour utiliser l'anticorps anti-phosphosérine19-MRLC^{Sqh} (Figure 29D). Alors qu'il était possible de voir les bandes dans le lysat et les bandes correspondants aux constructions (flèches noires), l'anticorps Anti-P-MRLC^{Sqh} n'a marqué aucune bande à 48 kDa (Figure 29D). Il est possible que nous n'ayons pas eu de P-MRLC^{Sqh} dans nos lysats cellulaires à cause des phosphatases. Mais l'incapacité de l'anticorps Anti-P-MRLC^{Sqh} à mettre en évidence une bande à 48 kDa nous a aussi fait questionner son efficacité et sa spécificité. Afin de répondre à ce questionnement, nous avons testé l'efficacité d'Anti-P-MRLC^{Sqh} par immunomarquage sur des cellules S2 fixées exprimant transitoirement, MRLC^{Sqh}-GFP et dont l'ADN a été marqué avec Hoechst (Figure 34 Annexe). Anti-P-MRLC^{Sqh} a bien marqué le sillon de clivage et l'AM, là où MRLC^{Sqh}-GFP a été recruté. Finalement, pour contourner les problèmes liés à l'état de phosphorylation de la myosine-II, nous avons utilisé des lysats MRLC^{Sqh-E20E21}-GFP. Malgré la présence de bandes dans le WCE et les culots (flèches noires), le MyoBD n'a pas pu extraire MRLC^{Sqh-E20E21}-GFP du lysat cellulaire (Figure 29E). Ces résultats, bien que négatifs, ne nous permettent pas de conclure qu'il n'y a pas d'interaction.

5 Discussion

Le but de ce projet était de déterminer le rôle du MyoBD de l'anilline durant la cytokinèse. Dans les cellules S2 de *Drosophila melanogaster*, la seule protéine qui a été rapportée comme interagissant avec le MyoBD est la protéine F-BAR syndapin, impliquée dans le couplage de la membrane plasmique avec l'AC (Takeda et al., 2013). Puisque l'interaction du MyoBD avec la myosine-II n'a été rapporté que dans *Xenopus* (Straight et al., 2005), la question de la conservation et de la fonctionnalité de cette interaction reste sans réponse. Dans les cellules S2 de drosophile, il a été démontré que la maturation de l'AM passe par un processus d'extrusion de membrane plasmique (contenant de l'anilline) appelé « shedding » durant lequel des forces de retrait par « shedding » et de rétention de l'anilline sont en concurrence. Le retrait de l'anilline est régi par son côté C-terminal par les interactions de son domaine PH avec les septines, alors que sa rétention est régie le côté N-terminal, principalement grâce aux interactions du domaine NTD avec la citron kinase, Sticky (El Amine et al., 2013). La raison derrière l'emploi des termes « principalement grâce à » pour qualifier la rétention dépendante de Sticky est une différence de phénotypes entre la déplétion de Sticky et la délétion du domaine de liaison à Sticky, le NTD. Il a été démontré que la déplétion de la septine Pnut et la délétion du domaine PH de l'anilline produisent le même phénotype, la rétention excessive de l'anilline et l'échec de la cytokinèse (El Amine et al., 2013). Cependant, la déplétion de Sticky cause du « shedding » excessif causant la perte complète de l'anilline alors que la délétion du NTD cause aussi beaucoup de « shedding » mais produit des AM minuscules. De plus, dans les cellules S2, l'actine est à des niveaux indétectables à l'AM, rendant une rétention dépendant de l'interaction anilline-ActBD/actine-F peu probable (El Amine et al., 2013; El-amine et al., 2019). Ces observations nous ont permis d'émettre l'hypothèse que le MyoBD de l'anilline est aussi impliqué dans le processus de rétention de l'anilline en interagissant avec la myosine-II durant la maturation de l'AM.

5.1 Le rôle du MyoBD durant la cytokinèse

Avant d'entamer des expériences requérant la déplétion de l'anilline endogène, l'efficacité de l'ARNdb utilisé contre l'anilline a été testée sur des cellules S2 de *Drosophila melanogaster*. La Figure 15 montre qu'après trois jours de déplétion, 89% des cellules exprimant la tubulline-mCherry ont échoué la cytokinèse contre 11% dans le contrôle négatif (LacI). Un phénotype attendu au vu du rôle important de l'anilline dans la cytokinèse. Il faut noter que les 89% des cellules qui ont échoué la cytokinèse n'ont pas forcément été déplétées complètement de l'anilline endogène. Toutefois, il suffit d'atteindre un seuil d'expression de l'anilline assez bas pour voir des échecs.

5.1.1 Le MyoBD est facultatif pour la cytokinèse

Pour commencer, nous avons testé la capacité de l'anilline Δ MyoBD et l'anilline WEDD à sauver la cytokinèse. Le WEDD étant un motif dont la séquence et la structure 3D sont conservés, cette conservation indique une fonction potentiellement importante dans le MyoBD. De plus, des mutations ponctuelles dans le WEDD réduisent les risques d'altération de la structure 3D de l'anilline qui peuvent potentiellement être causées par une grande délétion du domaine MyoBD.

Suivant la déplétion de l'anilline endogène, l'anilline Δ MyoBD et WEDD ont tous deux produit les mêmes phénotypes. D'abord, beaucoup de « blebbing » lors de la constriction de l'AC pouvant être causé par l'hyper-contractilité du cortex et un afflux de cytoplasme vers la membrane plasmique. Ensuite, une légère augmentation des échecs comparé à l'anilline FL (autour de 7%). Finalement, les AM produits par l'anilline Δ MyoBD et l'anilline WEDD semblent plus petits que ceux produits par l'anilline FL.

Ceci indique que le MyoBD est facultatif pour le résultat de la cytokinèse en tant que tel, mais potentiellement déterminant pour la taille de l'AM. Toutefois, nous travaillons avec un système de déplétion imparfait. La possibilité de la présence d'anilline endogène résiduelle capable de masquer un phénotype sévère est toujours présente. De plus, le fait que le MyoBD soit facultatif dans les cellules S2 de *Drosophila melanogaster* ne veut pas dire que cela sera le cas dans d'autres organismes ou bien dans un contexte

développemental. (Little et al., 2021) ont montré que la déplétion de Cep55, la protéine centrosomale, causait des délais d'abscission chez les cellules souches neuronales (CSN) de souris. Malgré un cerveau capable de croître et une taille corporelle presque normale, ces souris *Cep55*^{-/-} étaient atteintes de microcéphalie. On pourrait imaginer que des délais d'abscission causés par la mutation ou la troncation du MyoBD puissent amener à ce genre de malformation. Cela impliquerait un rôle du MyoBD de l'anilline dans le développement du cerveau.

Finalement, le fait que l'anilline WEDD phénotype l'anilline Δ MyoBD nous indique que la mutation WEDD semble affecter la fonction du MyoBD qui est de participer à la rétention de l'anilline à l'AM, en se liant à la myosine-II, selon notre hypothèse. De plus, la conservation du motif WEDD et de la structure 3D de la région où il réside renforce cette hypothèse (Figure 14).

5.1.2 La troncation et la mutation du MyoBD perturbent l'abscission

L'observation des mutants anilline Δ MyoBD et WEDD a aussi permis de révéler un rôle potentiel dans le processus d'abscission. En effet, on remarque qu'une grande partie de la population de cellules qui ont réussi la cytokinèse, l'ont réussi avec un retard d'abscission. Le retard d'abscission est comptabilisé lorsque les deux cellules filles passent plus de 10 heures attachées avec un AM. Certaines cellules exprimant l'anilline Δ MyoBD et l'anilline WEDD ne font l'abscission qu'au début de la prochaine division cellulaire (Figure 17A), prenant la forme parfois d'une chaîne de cellules rattachées ensemble par des AM, similaire à la déplétion de *Shrub/CHMP4B*, une composante de la machinerie ESRCT-III d'abscission chez la drosophile (El Amine et al., 2013).

De plus, il a été reporté que la myosine-II était requise pour la génération d'un site secondaire de constriction, à côté de l'AM, essentiel pour l'abscission chez les mammifères (Wang et al., 2019). Une petite dose de blebbistatin, afin d'inhiber l'activité motrice de la myosine-II, a empêché le recrutement de Cep55 aux régions flanquant l'AM ainsi que l'étape d'abscission subséquente. On peut hypothétiser que la perte du MyoBD puisse retarder l'abscission des cellules S2 en inhibant le recrutement de la myosine-II à des sites similaires, causant des défauts de recrutement de la machinerie d'abscission. Il

serait possible de tester cette hypothèse en observant le recrutement de Shrub, ou une autre composante de la machinerie ESCRT-III, en présence de l'anilline Δ MyoBD ou de l'anilline WEDD.

5.1.3 Le MyoBD participe à la rétention de l'anilline À l'AM

Bien que le MyoBD soit facultatif pour la cytokinèse, nous avons observé une différence de taille entre les AM formés par l'anilline Δ MyoBD et l'anilline FL. La taille des AM a été déterminée en se basant sur l'anilline comme marqueur et considérée comme le volume occupé par l'anilline. Il aurait été possible de choisir d'autres marqueurs comme la myosine-II, cependant, il n'est pas certain que la troncation du MyoBD de l'anilline ne les affecterait pas aussi. De plus, le choix de l'anilline comme marqueur nous permet de directement répondre à notre hypothèse de rétention.

Pour quantifier cette différence de taille, nous avons d'abord fait exprimer l'anilline Δ MyoBD et l'anilline FL séparément, et ensuite en co-transfections. Nos données montrent qu'après comparaison des tailles des AM matures, l'anilline Δ MyoBD forme en moyenne des AM moins volumineux que l'anilline FL (Figure 18B). Il est possible de concevoir qu'un corps fait de matière diminue en volume par restructuration/condensation ou par perte de matériel. De même qu'il est possible de concevoir que les AM formés par l'anilline Δ MyoBD perdent plus en volume que ceux formés par l'anilline FL via les mêmes mécanismes. Dans ce cas, un changement structural de l'AM causé par la troncation du MyoBD n'entraînera qu'une différence de volume entre les AM formés par l'anilline Δ MyoBD et l'anilline FL. Par contre, si la troncation du MyoBD diminue la rétention de l'anilline à l'AM, les AM formés par l'anilline Δ MyoBD et l'anilline FL seront différents en volumes mais aussi en intensité de fluorescence. Dans les deux cas, la taille des AM produits sera plus petite mais l'intensité de fluorescence ne diminuerait que suivant l'hypothèse de rétention. Toutefois, relativement aux volumes initiaux respectifs, les AM formés par l'anilline Δ MyoBD perdent graduellement plus en volume que ceux formés par l'anilline FL (Figure 18C). De plus, la co-expression de l'anilline Δ MyoBD et l'anilline FL dans les mêmes cellules a montré que l'intensité de fluorescence de l'anilline Δ MyoBD à l'AM diminue plus que celle de l'anilline FL (Figure

19C). Ces observations consolident l'hypothèse de rétention plutôt que celle du changement structural.

5.2 Une interdépendance entre le MyoBD et la myosine-II durant la cytokinèse

Cette étude est une façon contournée de tester l'interaction MyoBD/myosine-II dans le contexte de la cytokinèse. Même si cela ne constitue pas un test d'interaction direct, ces tests vont nous permettre de comprendre jusqu'à quel point la myosine-II et le MyoBD peuvent être dépendants l'un de l'autre en termes de recrutement.

5.2.1 Le MyoBD est recruté au sillon de clivage grâce à la myosine-II et au motif WEDD

Les tronçons d'anilline MyoBD et MyoActBDa sont recrutés uniquement au sillon de clivage, au tout début de la constriction d'une manière transitoire ne dépassant pas 2 à 3 minutes (Figure 20B). Il nous était impossible de voir un recrutement avant cela, en métaphase ou après, à l'AM. Ce recrutement transitoire de 2 à 3 minutes peut refléter une fenêtre de temps où la P-myosine-II est disponible. De plus, la suractivation de la myosine-II permet d'amplifier et de prolonger considérablement la durée de recrutement du MyoBD permettant de le voir recruté au cortex même en métaphase, alors que l'inactivation de la myosine-II inhibe complètement tout recrutement (Figure 21A). Ceci nous indique que le recrutement du MyoBD est entièrement dépendant de la P-myosine-II.

Par ailleurs, la mutation WEDD-AAAA du MyoActBDa inhibe complètement son recrutement au sillon de clivage, même si la myosine-II est suractivée. Cela indique que, non seulement le recrutement du MyoBD est entièrement dépendant de la P-myosine-II, mais ce recrutement est aussi dépendant du motif WEDD au sein du MyoBD. Toutefois, il n'est pas clair que ce recrutement est dû à une interaction directe entre le MyoBD et la myosine-II. Il est tout à fait possible qu'une protéine puisse servir d'intermédiaire comme l'actine. En effet, non seulement l'actine peut interagir avec la myosine, mais aussi potentiellement avec le MyoBD (Jananji et al., 2017; Straight et al., 2005). Cette hypothèse peut être vérifiée par des tests d'interaction de type pull down du MyoBD de

l'anilline avec des lysats, contenant entre autres de l'actine et de la myosine, et provenant de cellules traitées au LatA ou au MRLC^{sqh} ARNi.

5.2.2 Le MyoBD est recruté aux structures LatA grâce à la myosine-II et au motif WEDD

Afin de nous assurer que le recrutement du MyoBD dépendant de la myosine-II n'est pas médié par l'actine, nous avons traité des cellules S2 avec Latrunculine A (LatA) pour 30 minutes. Ceci permet la dépolymérisation de l'actine F et la formation de structures LatA protubérantes dépendante de l'anilline, des septines et de Rho (Figure 22) (Hickson & O'Farrell, 2008). Étant donné que ces structures LatA protubérantes recrutent aussi de la myosine-II, le recrutement du MyoBD à ces structures nous permettrait d'écarter la possibilité d'une médiation par l'actine F. De plus, la myosine-II est capable de se localiser à la membrane plasmique en LatA même sans l'anilline (structures LatA non protubérantes). Étant donné que cette localisation non-protubérante est sans forme précise, elle est facilement différenciable des structures LatA protubérantes formées par l'anilloseptine (anilline et septines) (Figure 23A).

En présence d'anilline endogène, la myosine-II, le MyoBD et le MyoActBDa sont recrutés aux structures LatA protubérantes, alors que suite à la déplétion de l'anilline endogène, tous trois sont recrutés aux structures LatA non protubérantes (Figure 22). Le MyoBD semble donc suivre la myosine-II dans son recrutement. D'un côté, la suractivation de la myosine amplifie le recrutement du MyoBD aux structures LatA non protubérantes, et d'un autre côté, l'inactivation de la myosine-II ou la mutation WEDD inhibe complètement ce recrutement. Ces résultats suggèrent fortement une interdépendance MyoBD/P-myosine-II par l'intermédiaire du motif WEDD et sans la médiation de l'actine F.

5.2.3 L'anilline Δ MyoBD est incapable de recruter la myosine-II aux structures LatA protubérantes

Pour être recrutés aux structures LatA protubérantes, le MyoBD dépend de la myosine-II et la myosine-II dépend de l'anilline (Figure 23A). Nous nous sommes donc

demandé si l'anilline Δ MyoBD pouvait recruter la myosine-II aux structures LatA protubérantes. Comme attendu, contrairement à l'anilline FL, l'anilline Δ MyoBD était incapable de recruter la myosine-II aux structures LatA protubérantes. L'anilline Δ MyoBD a bien été capable de former les structures LatA protubérantes mais la myosine-II a été recrutée aux structures LatA non protubérantes comme s'il n'y avait pas d'anilline. Sachant que les structures LatA protubérantes sont composées d'un grand nombre de protéines normalement recrutées au sillon de clivage, ces résultats suggèrent que le MyoBD de l'anilline est le seul élément présent dans ces structures LatA capable de recruter la myosine-II.

5.3 Le NTD joue un rôle inhibiteur du MyoBD au sein de l'anilline.

Le NTD de l'anilline occupe une fonction importante dans la cytokinèse. Par sa liaison avec Sticky (El-amine et al., 2019), le NTD régit le processus de maturation de l'AM et contribue grandement à la rétention de l'anilline à l'AM. Cependant, dépléter Sticky ne donne pas le même phénotype que la troncation du NTD. Alors que la déplétion de Sticky résulte en une incapacité à retenir l'anilline et à former un AM, la troncation du NTD de l'anilline permet une certaine rétention suffisante à la formation de minuscules AM (El Amine et al., 2013; El-amine et al., 2019). Cette observation met la lumière sur le rôle du MyoBD, mais elle met aussi la lumière sur une potentielle action inhibitrice du NTD sur le MyoBD.

Premièrement, l'essai FRAP effectué sur l'anilline NMAC, MAC et AC montre que l'ajout du NTD semble inhiber l'augmentation du temps de rétention au cortex observé après l'ajout du MyoBD (Figure 27).

Deuxièmement, l'expression d'une troncation d'anilline contenant seulement le NTD et le MyoBD, l'anilline NTD-MyoBD, ne nous permet de voir aucun recrutement transitoire typique du MyoBD au sillon de clivage, et cela même si la myosine-II a été suractivée (Figure 28A-D). On observe plutôt un recrutement tardif, survenant après la formation de l'AM similaire à celui observé en exprimant le NTD seul (données non publiées). En ce sens, l'anilline NTD-MyoBD ne semble pas se comporter comme le MyoBD

mais plutôt comme l'anilline NTD. Ces résultats suggèrent que le NTD joue un rôle inhibiteur du MyoBD au sein de l'anilline.

Finalement, les constructions d'anilline FL, Δ MyoBD et WEDD ne donnent pas le même phénotype suggérant que ce rôle inhibiteur doit forcément cesser durant la cytokinèse (Figure 16C). Nous hypothétisons que l'étirement physique de l'anilline, d'un côté par Sticky, et d'un autre côté par les septines, déplie le NTD du MyoBD permettant l'accès à la myosine ou toute autre protéine pouvant s'y lier. Les forces causant cet étirement sont, à un certain égard, une reproduction à petite échelle des forces de retrait et de rétention appliquées sur l'anilline durant le processus de maturation de l'AM.

5.4 Test de l'interaction du MyoBD avec la myosine-II

Jusqu'à présent, nos résultats soutiennent fortement l'hypothèse de l'interaction de la myosine-II avec le MyoBD de l'anilline, mais sans réellement la tester. Pour tester cette interaction, des essais de pull down où la capacité du MyoBD et du MyoActBDa à extraire la myosine-II de lysats S2 exprimant MRLC^{Sqh}-GFP ont été testés dans différentes configurations. D'abord, en présence et en absence de cytochalasine D, une drogue causant la dépolymérisation de l'actine F et écartant une interférence potentielle. Ensuite, en suractivant la myosine avec un traitement à l'ARNi contre MBS. Et finalement, en testant la capacité du MyoBD et du MyoActBDa à extraire la myosine de lysats S2 exprimant MRLC^{SqhE20E21}-GFP, une forme constitutivement active de myosine. Tous nos essais de pull down ont été négatifs (Figure 29).

Dans notre cas, en absence de contrôle positif, un résultat négatif ne veut pas forcément dire que l'interaction n'a pas lieu durant la cytokinèse. Il est tout à fait possible que l'interaction nécessite une configuration *in vivo*, en présence de kinases comme Rok pour phosphoryler la myosine-II. Effectivement, l'utilisation de l'anticorps Anti-P-MRLC^{Sqh} n'a permis de révéler aucune bande dans le culot, même après l'usage d'ARNdb pour la suractivation de la myosine-II du lysat cellulaire (Figure 29D). Ces résultats suggèrent que la myosine-II présente dans les lysats cellulaires n'est pas phosphorylé, et donc pas apte à se lier au MyoBD. Toutefois, l'utilisation de lysats MRLC^{SqhE20E21}-GFP aurait pu nous aider

à régler ce problème. Mais même s'il y avait des quantités suffisantes de MRLC^{SqhE20E21}-GFP dans nos lysats, le résultat du test de pull down est resté négatif. Il est à noter que dans ce cas, malgré que MRLC^{SqhE20E21} agisse comme un phospho-mimétique *in vivo* chez *Drosophila melanogaster* (Winter et al., 2001), on ne sait pas si MRLC^{SqhE20E21} se comporte réellement comme la P-myosine dans un contexte *in vitro*.

Une autre possibilité qui expliquerait ces résultats négatifs serait liée à l'étape de production des constructions MyoBD et MyoActBDa avant leur purification. Durant cette étape, les constructions sont exprimées dans des bactéries BL21 spécialisées dans la production de protéines. Les bactéries étant très éloignées évolutivement des insectes, des modifications post-traductionnelles nécessaires pour la fonction ou le bon repliement de la protéine seraient peut-être manquantes. L'utilisation de cellules Sf9 d'insectes serait peut-être une meilleure alternative.

Finalement, l'utilisation de différents inhibiteurs de phosphatases nous aurait peut-être aussi permis de garder des niveaux de P-myosine détectable par western blot.

5.5 Modèle

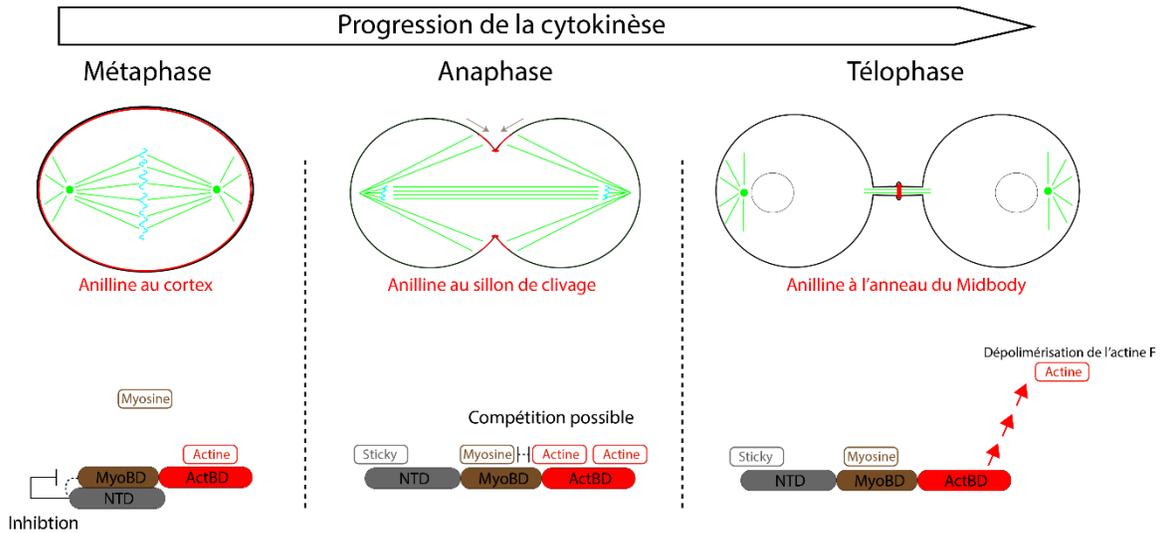


Figure 30 : Modèle montrant l'état de repliement hypothétique de l'anilline N-terminale durant la cytokinèse.

Au vu de nos résultats, même si les essais biochimiques n'ont pas été concluants, nos tests d'interdépendance de recrutement du MyoBD et de la myosine-II corroborent l'interaction rapportée par (Straight et al 2005). Notre modèle serait qu'en métaphase, le NTD serait replié sur le MyoBD occupant l'espace nécessaire pour la liaison à la myosine-II. En anaphase, après le recrutement de Sticky, de l'anilline et des septines au sillon de clivage, l'anilline serait étirée pour déplier le NTD laissant la voie libre pour des interactions avec la myosine-II. Cependant, comme le MyoBD pourrait bien contenir un site de liaison à l'actine, une compétition entre la myosine-II et l'actine-F serait envisageable. Finalement, en télophase, l'actine-F est perdue graduellement de l'AM par dépolymérisation permettant à l'anilline de consolider ses interactions avec la myosine-II et les autres protéines de l'AM (Figure 30).

5.6 Perspectives de recherche

Cette étude a permis de mieux cerner le rôle de l'anilline-MyoBD durant la cytokinèse. D'une part, nos résultats suggèrent que l'anilline-MyoBD est facultatif pour la cytokinèse mais important pour la rétention de l'anilline à l'AM. Ainsi, la troncation ou la mutation du motif WEDD produit des AM plus petits et des retards d'abscission. Cela suggère un lien entre le degré de rétention de l'anilline à l'AM et le temps qu'une cellule prend pour faire l'abscission. Il serait donc intéressant de voir le comportement du complexe ESCRT-III dans ces conditions et de tester la capacité des petits AM à recruter Shrub (une sous-unité d'ESCRT-III). De plus, comme mentionné précédemment, le caractère facultatif du MyoBD n'a été démontré que dans les cellules S2, avec une déplétion incomplète de l'anilline endogène (ARNi) et dans un système où les constructions d'anilline sont surexprimées. Afin de contrecarrer ces limitations, il serait possible d'avoir recours à des techniques d'ingénierie génomique comme CRISPR/Cas9 pour créer des Knockout d'anilline et exprimer nos mutants avec des niveaux d'expression semblables à l'endogène. Il serait aussi intéressant de voir quel effet aura la troncation du MyoBD de l'anilline sur le développement de la drosophile, puisque des retards d'abscission dans des souris *Cep55*^{-/-} ont causé de la microcéphalie (Little et al., 2021).

D'une autre part, cette étude a montré que l'anilline-NTD et la mutation WEDD avaient une action inhibitrice sur l'anilline-MyoBD. Cette inhibition pourrait être testée par des essais pull down optimisés. Nos tests pull down ont montré que la difficulté pour tester l'interaction anilline-MyoBD/myosine-II était d'obtenir des quantités suffisantes de P-MRLC^{S^{qh}} dans les lysats cellulaires. Il serait alors préférable d'utiliser des inhibiteurs de phosphatases à large spectre et d'optimiser la procédure de lyse cellulaire afin de limiter la déphosphorylation de la myosine-II. Possédant déjà les constructions GST-NTD-MyoBD, GST-MyoBD, GST-MyoActBDa et GST-MyoActBDaWEDD, il serait possible de tester leur capacité à extraire la myosine-II de lysats cellulaires où la P-myosine est présente. Dans la condition que le MyoBD interagisse avec la myosine-II, on s'attendrait à ce que GST-NTD-MyoBD et GST-MyoActBDaWEDD ne puissent pas extraire de myosine-II du lysat

cellulaire. L'utilisation de drogues dépolymérisant l'actine-F peut aussi servir afin de tester une possible compétition entre l'actine-F et la myosine-II pour la liaison à l'anilline-MyoBD.

6 Conclusion

Ce projet avait pour but de mettre la lumière sur le rôle du MyoBD de l'anilline, autre inconnu, durant la cytokinèse. D'une part, en analysant le phénotype résultant de la troncation ou de la mutation du MyoBD durant la cytokinèse, et d'une autre part, en testant l'interaction du MyoBD avec la myosine-II, directement par des essais de biochimie, ou indirectement par des tests d'interdépendance de recrutement. Notre hypothèse était que le MyoBD, par son interaction avec la myosine-II participe à la rétention de l'anilline durant le processus de maturation de l'AM.

Nous avons montré que la mutation ou la troncation du MyoBD n'affectait pas forcément la cytokinèse. Cela affectait plutôt la rétention de l'anilline à l'AM et les temps d'abscission. Ainsi, nous proposons un rôle du MyoBD dans la rétention de l'anilline et dans le processus d'abscission. De plus, malgré des résultats de test d'interaction négatifs, notre étude montre qu'il y a une forte interdépendance entre le MyoBD de l'anilline et la myosine-II en termes de recrutement qui requière le motif WEDD du MyoBD.

Finalement, ce projet a permis de mieux comprendre le rôle du MyoBD durant la cytokinèse et ouvre la voie à de nouvelles études sur une potentielle implication de ce domaine dans le processus d'abscission.

7 Références

- Baserga, R. (1965). The Relationship of the Cell Cycle to Tumor Growth and Control of Cell Division : A Review. *Cancer Research*, 25(5 Part 1), 581-595.
https://cancerres.aacrjournals.org/content/25/5_Part_1/581
- Blomberg, N., Baraldi, E., Nilges, M., & Saraste, M. (1999). The PH superfold : A structural scaffold for multiple functions. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(11), 441-445. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(99\)01472-3](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(99)01472-3)
- Cao, L. G., & Wang, Y. L. (1996). Signals from the spindle midzone are required for the stimulation of cytokinesis in cultured epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, 7(2), 225-232. <https://doi.org/10.1091/mbc.7.2.225>
- Carim, S. C., Kechad, A., & Hickson, G. R. X. (2020). Animal Cell Cytokinesis : The Rho-Dependent Actomyosin-Anilloseptin Contractile Ring as a Membrane Microdomain Gathering, Compressing, and Sorting Machine. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 575226. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.575226>
- D'Avino, P. P., Takeda, T., Capalbo, L., Zhang, W., Lilley, K. S., Laue, E. D., & Glover, D. M. (2008). Interaction between Anillin and RacGAP50C connects the actomyosin contractile ring with spindle microtubules at the cell division site. *Journal of Cell Science*, 121(8), 1151-1158. <https://doi.org/10.1242/jcs.026716>
- Dechant, R., & Glotzer, M. (2003). Centrosome Separation and Central Spindle Assembly Act in Redundant Pathways that Regulate Microtubule Density and Trigger Cleavage Furrow Formation. *Developmental Cell*, 4(3), 333-344.
[https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00057-1](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00057-1)

- Devore, J. J., Conrad, G. W., & Rappaport, R. (1989). A model for astral stimulation of cytokinesis in animal cells. *Journal of Cell Biology*, *109*(5), 2225-2232.
<https://doi.org/10.1083/jcb.109.5.2225>
- El Amine, N., Kechad, A., Jananji, S., & Hickson, G. R. X. (2013). Opposing actions of septins and Sticky on Anillin promote the transition from contractile to midbody ring. *The Journal of Cell Biology*, *203*(3), 487-504.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201305053>
- El-amine, N., Carim, S. C., Wernike, D., & Hickson, G. R. X. (2019). Rho-dependent control of the Citron kinase, Sticky, drives midbody ring maturation. *Molecular Biology of the Cell*, *30*(17), 2185-2204. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-04-0194>
- Elia, N., Sougrat, R., Spurlin, T. A., Hurley, J. H., & Lippincott-Schwartz, J. (2011). Dynamics of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery during cytokinesis and its role in abscission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(12), 4846-4851.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1102714108>
- Foster, I. (2008). Cancer : A cell cycle defect. *Radiography*, *14*(2), 144-149.
<https://doi.org/10.1016/j.radi.2006.12.001>
- Gai, M., Camera, P., Dema, A., Bianchi, F., Berto, G., Scarpa, E., Germena, G., & Di Cunto, F. (2011). Citron kinase controls abscission through RhoA and anillin. *Molecular Biology of the Cell*, *22*(20), 3768-3778. <https://doi.org/10.1091/mbc.e10-12-0952>
- Green, R. A., Mayers, J. R., Wang, S., Lewellyn, L., Desai, A., Audhya, A., & Oegema, K. (2013). The midbody ring scaffolds the abscission machinery in the absence of

- midbody microtubules. *Journal of Cell Biology*, 203(3), 505-520.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201306036>
- Green, R. A., Paluch, E., & Oegema, K. (2012). Cytokinesis in animal cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28, 29-58. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155718>
- Guizetti, J., Schermelleh, L., Mäntler, J., Maar, S., Poser, I., Leonhardt, H., Müller-Reichert, T., & Gerlich, D. W. (2011). Cortical Constriction During Abscission Involves Helices of ESCRT-III-Dependent Filaments. *Science*, 331(6024), 1616-1620. <https://doi.org/10.1126/science.1201847>
- Hickson, G. R. X., & O'Farrell, P. H. (2008). Rho-dependent control of anillin behavior during cytokinesis. *The Journal of Cell Biology*, 180(2), 285-294.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200709005>
- Hu, C.-K., Coughlin, M., & Mitchison, T. J. (2012). Midbody assembly and its regulation during cytokinesis. *Molecular Biology of the Cell*, 23(6), 1024-1034.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e11-08-0721>
- Jackman, M., Lindon, C., Nigg, E. A., & Pines, J. (2003). Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nature Cell Biology*, 5(2), 143-148.
<https://doi.org/10.1038/ncb918>
- Jananji, S., Risi, C., Lindamulage, I. K. S., Picard, L.-P., Van Sciver, R., Laflamme, G., Albaghjati, A., Hickson, G. R. X., Kwok, B. H., & Galkin, V. E. (2017). Multimodal and Polymorphic Interactions between Anillin and Actin : Their Implications for

- Cytokinesis. *Journal of Molecular Biology*, 429(5), 715-731.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.01.020>
- Johnson, D. G., & Walker, C. L. (1999). Cyclins and Cell Cycle Checkpoints. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39(1), 295-312.
<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.295>
- Kechad, A., Jananji, S., Ruella, Y., & Hickson, G. R. X. (2012). Anillin Acts as a Bifunctional Linker Coordinating Midbody Ring Biogenesis during Cytokinesis. *Current Biology*, 22(3), 197-203. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.11.062>
- Kinoshita, M., Field, C. M., Coughlin, M. L., Straight, A. F., & Mitchison, T. J. (2002). Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins. *Developmental Cell*, 3(6), 791-802. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(02\)00366-0](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00366-0)
- Kučera, O., Siahaan, V., Janda, D., Dijkstra, S. H., Pilátová, E., Zatecka, E., Diez, S., Braun, M., & Lansky, Z. (2021). Anillin propels myosin-independent constriction of actin rings. *Nature Communications*, 12(1), 4595. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24474-1>
- Kühn, S., & Geyer, M. (2014). Formins as effector proteins of Rho GTPases. *Small GTPases*, 5(3), e983876. <https://doi.org/10.4161/sgtp.29513>
- Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F. G., & Taylor, S. S. (2012). The Spindle Assembly Checkpoint. *Current Biology*, 22(22), R966-R980.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.10.006>
- Lie-Jensen, A., Ivanauskiene, K., Malerød, L., Jain, A., Tan, K. W., Laerdahl, J. K., Liestøl, K., Stenmark, H., & Haglund, K. (2019). Centralspindlin Recruits ALIX to the

- Midbody during Cytokinetic Abcission in *Drosophila* via a Mechanism Analogous to Virus Budding. *Current Biology*, 29(20), 3538-3548.e7.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.09.025>
- Little, J. N., McNeely, K. C., Michel, N., Bott, C. J., Lettieri, K. S., Hecht, M. R., Martin, S. A., & Dwyer, N. D. (2021). Loss of Coiled-Coil Protein Cep55 Impairs Neural Stem Cell Abcission and Results in p53-Dependent Apoptosis in Developing Cortex. *The Journal of Neuroscience*, 41(15), 3344-3365.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1955-20.2021>
- Ma, X., Kovács, M., Conti, M. A., Wang, A., Zhang, Y., Sellers, J. R., & Adelstein, R. S. (2012). Nonmuscle myosin II exerts tension but does not translocate actin in vertebrate cytokinesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(12), 4509-4514. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116268109>
- Madaule, P., Eda, M., Watanabe, N., Fujisawa, K., Matsuoka, T., Bito, H., Ishizaki, T., & Narumiya, S. (1998). Role of citron kinase as a target of the small GTPase Rho in cytokinesis. *Nature*, 394(6692), 491-494. <https://doi.org/10.1038/28873>
- Miller, A. L. (2011). The contractile ring. *Current Biology*, 21(24), R976-R978.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.10.044>
- Morita, E., Sandrin, V., Chung, H.-Y., Morham, S. G., Gygi, S. P., Rodesch, C. K., & Sundquist, W. I. (2007). Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *The EMBO Journal*, 26(19), 4215-4227.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601850>

- Nezi, L., & Musacchio, A. (2009). Sister chromatid tension and the spindle assembly checkpoint. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(6), 785-795.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.09.007>
- Oegema, K., Savoian, M. S., Mitchison, T. J., & Field, C. M. (2000). Functional Analysis of a Human Homologue of the Drosophila Actin Binding Protein Anillin Suggests a Role in Cytokinesis. *Journal of Cell Biology*, 150(3), 539-552.
<https://doi.org/10.1083/jcb.150.3.539>
- Oliferenko, S., Chew, T. G., & Balasubramanian, M. K. (2009). Positioning cytokinesis. *Genes & Development*, 23(6), 660-674. <https://doi.org/10.1101/gad.1772009>
- Peterman, E., Gibieža, P., Schafer, J., Skeberdis, V. A., Kaupinis, A., Valius, M., Heiligenstein, X., Hurbain, I., Raposo, G., & Prekeris, R. (2019). The post-abscission midbody is an intracellular signaling organelle that regulates cell proliferation. *Nature Communications*, 10(1), 3181.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-10871-0>
- Piekny, A. J., & Glotzer, M. (2008). Anillin is a scaffold protein that links RhoA, actin, and myosin during cytokinesis. *Current Biology: CB*, 18(1), 30-36.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.11.068>
- Piekny, A. J., & Maddox, A. S. (2010). The myriad roles of Anillin during cytokinesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21(9), 881-891.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2010.08.002>

- Piekny, A., Werner, M., & Glotzer, M. (2005). Cytokinesis : Welcome to the Rho zone. *Trends in Cell Biology*, 15(12), 651-658.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.10.006>
- Rappaport, R. (1961). Experiments concerning the cleavage stimulus in sand dollar eggs. *J. Exp*, 48-81.
- Satterwhite, L. L., & Pollard, T. D. (1992). Cytokinesis. *Current Opinion in Cell Biology*, 4(1), 43-52. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(92\)90057-J](https://doi.org/10.1016/0955-0674(92)90057-J)
- Schroeder, T. E. (1975). Dynamics of the contractile ring. *Society of General Physiologists Series*, 30, 305-334.
- Spira, F., Cuylen-Haering, S., Mehta, S., Samwer, M., Reversat, A., Verma, A., Oldenbourg, R., Sixt, M., & Gerlich, D. W. (2017). Cytokinesis in vertebrate cells initiates by contraction of an equatorial actomyosin network composed of randomly oriented filaments. *eLife*, 6, e30867.
<https://doi.org/10.7554/eLife.30867>
- Straight, A. F., Field, C. M., & Mitchison, T. J. (2005). Anillin Binds Nonmuscle Myosin II and Regulates the Contractile Ring. *Molecular Biology of the Cell*, 16(1), 193-201.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e04-08-0758>
- Takeda, T., Robinson, I. M., Savoian, M. M., Griffiths, J. R., Whetton, A. D., McMahon, H. T., & Glover, D. M. (2013). Drosophila F-BAR protein Syndapin contributes to coupling the plasma membrane and contractile ring in cytokinesis. *Open Biology*, 3(8), 130081. <https://doi.org/10.1098/rsob.130081>

- Tunyasuvunakool, K., Adler, J., Wu, Z., Green, T., Zielinski, M., Žídek, A., Bridgland, A., Cowie, A., Meyer, C., Laydon, A., Velankar, S., Kleywegt, G. J., Bateman, A., Evans, R., Pritzel, A., Figurnov, M., Ronneberger, O., Bates, R., Kohl, S. A. A., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. *Nature*, *596*(7873), 590-596. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03828-1>
- Uetake, Y., & Sluder, G. (2010). Prolonged Prometaphase Blocks Daughter Cell Proliferation Despite Normal Completion of Mitosis. *Current Biology*, *20*(18), 1666-1671. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.08.018>
- Uhlmann, F., Lottspeich, F., & Nasmyth, K. (1999). Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature*, *400*(6739), 37-42. <https://doi.org/10.1038/21831>
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., & Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle : A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*, *36*(3), 131-149. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x>
- Wang, K., Wloka, C., & Bi, E. (2019). Non-muscle Myosin-II Is Required for the Generation of a Constriction Site for Subsequent Abscission. *iScience*, *13*, 69-81. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.02.010>
- White, J. G., & Borisy, G. G. (1983). On the mechanisms of cytokinesis in animal cells. *Journal of Theoretical Biology*, *101*(2), 289-316. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(83\)90342-9](https://doi.org/10.1016/0022-5193(83)90342-9)
- Winter, C. G., Wang, B., Ballew, A., Royou, A., Karess, R., Axelrod, J. D., & Luo, L. (2001). Drosophila Rho-Associated Kinase (Drok) Links Frizzled-Mediated Planar Cell

- Polarity Signaling to the Actin Cytoskeleton. *Cell*, 105(1), 81-91.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00298-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00298-7)
- Wolfe, B. A., & Glotzer, M. (2009). Single cells (put a ring on it). *Genes & Development*, 23(8), 896-901. <https://doi.org/10.1101/gad.1801209>
- Yamashiro, S., Totsukawa, G., Yamakita, Y., Sasaki, Y., Madaule, P., Ishizaki, T., Narumiya, S., & Matsumura, F. (2003). Citron Kinase, a Rho-dependent Kinase, Induces Diphosphorylation of Regulatory Light Chain of Myosin II. *Molecular Biology of the Cell*, 14(5), 1745-1756. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-07-0427>
- Yu, C.-H., Redemann, S., Wu, H.-Y., Kiewisz, R., Yoo, T. Y., Conway, W., Farhadifar, R., Müller-Reichert, T., & Needleman, D. (2019). Central-spindle microtubules are strongly coupled to chromosomes during both anaphase A and anaphase B. *Molecular Biology of the Cell*, 30(19), 2503-2514.
<https://doi.org/10.1091/mbc.E19-01-0074>
- Yüce, Ö., Piekny, A., & Glotzer, M. (2005). An ECT2–centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA. *Journal of Cell Biology*, 170(4), 571-582.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200501097>
- Zhao, W., Seki, A., & Fang, G. (2006). Cep55, a Microtubule-bundling Protein, Associates with Centralspindlin to Control the Midbody Integrity and Cell Abscission during Cytokinesis. *Molecular Biology of the Cell*, 17(9), 3881-3896.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e06-01-0015>

8 Annexe

8.1 Le MyoBD est facultatif pour une grande partie la cytokinèse

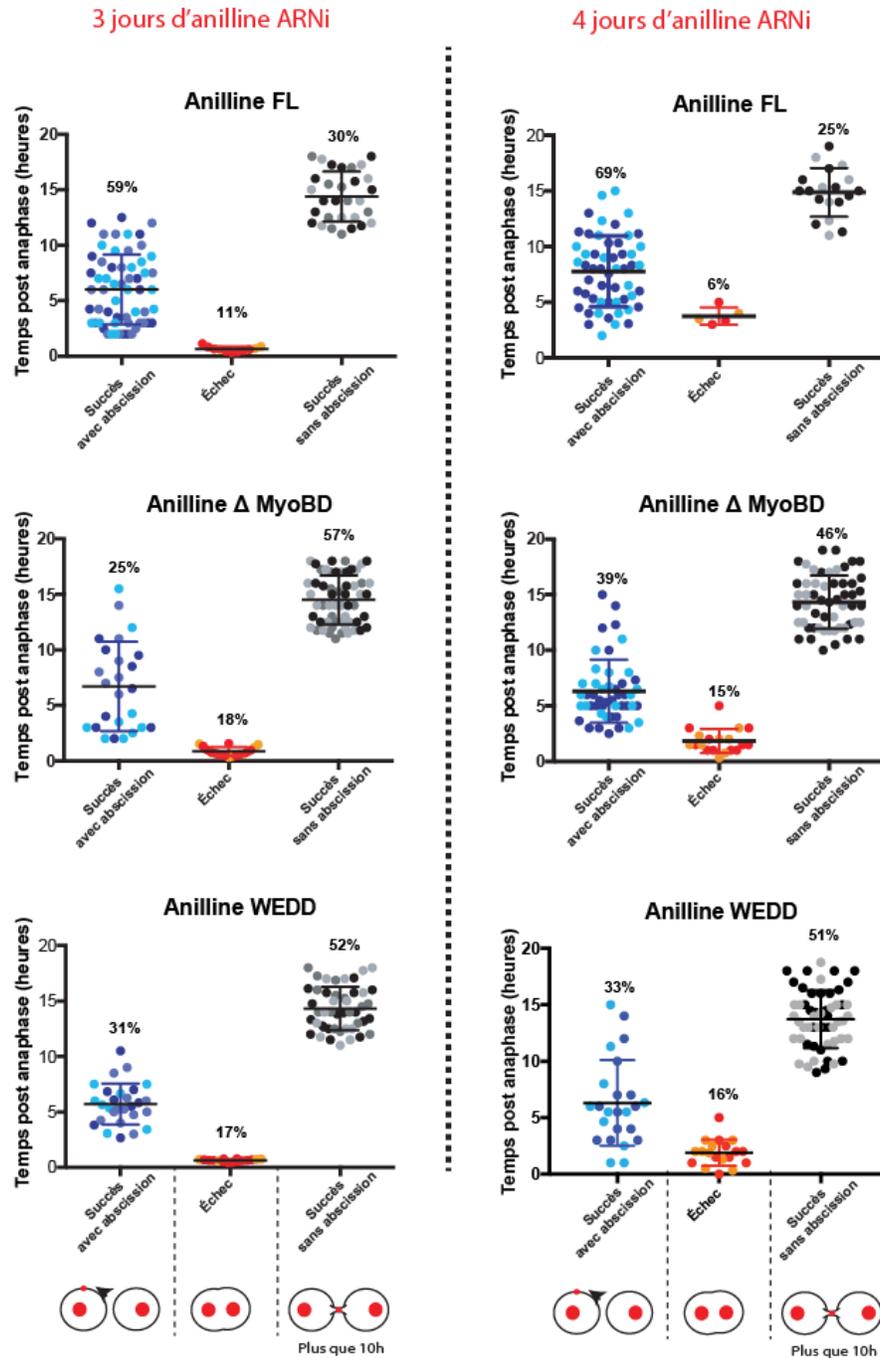


Figure 31 : Les mutants anilline- Δ MyoBD et anilline-WEDD sauvent en grande partie la cytokinèse.

Quantification du résultat de la cytokinèse; Succès avec abscission; Échec=cellules binucléaire; Succès sans abscission=Abscission retardée (plus de 10 heures sans abscission). 3 jours d'ARNi,

anilline-FL-GFP (n=3, N=108), anilline- Δ MyoBD-GFP (n=3, N=104), anilline-WEDD-GFP (n=3, N=98). 4 jours d'ARNi, anilline-FL-GFP (n=2, N=85), anilline- Δ MyoBD-GFP (n=2, N=93), anilline-WEDD-GFP (n=2, N=91). Chaque point représente une cellule. Les différentes nuances de couleurs représentent des séries de données d'expériences indépendantes.

8.2 La localisation du MyoBD et du MyoActBDa diffère en interphase

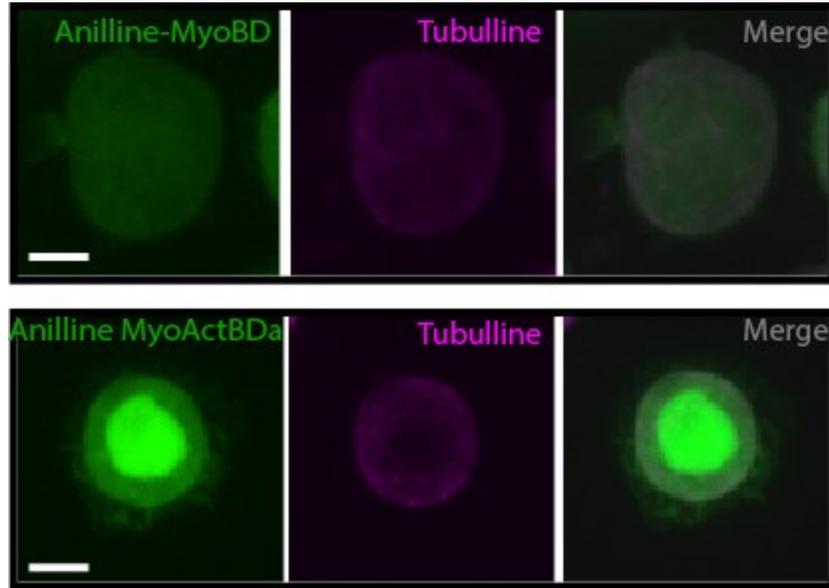


Figure 32 : Le MyoBD est complètement diffus dans le cytoplasme alors que le MyoActBDa est partiellement nucléaire.

Image d'une séquence de time-lapse montrant la localisation de l'anilline-MyoBD-GFP et l'anilline-MyoActBDa-GFP co-exprimés avec la tubulline-mCherry durant l'interphase. Projection d'intensité maximale de 11 z confocaux (1 μ m par tranche), objectif 63x. La barre représente 7 μ m.

8.3 La délétion du MyoBD cause des retards d'abscission

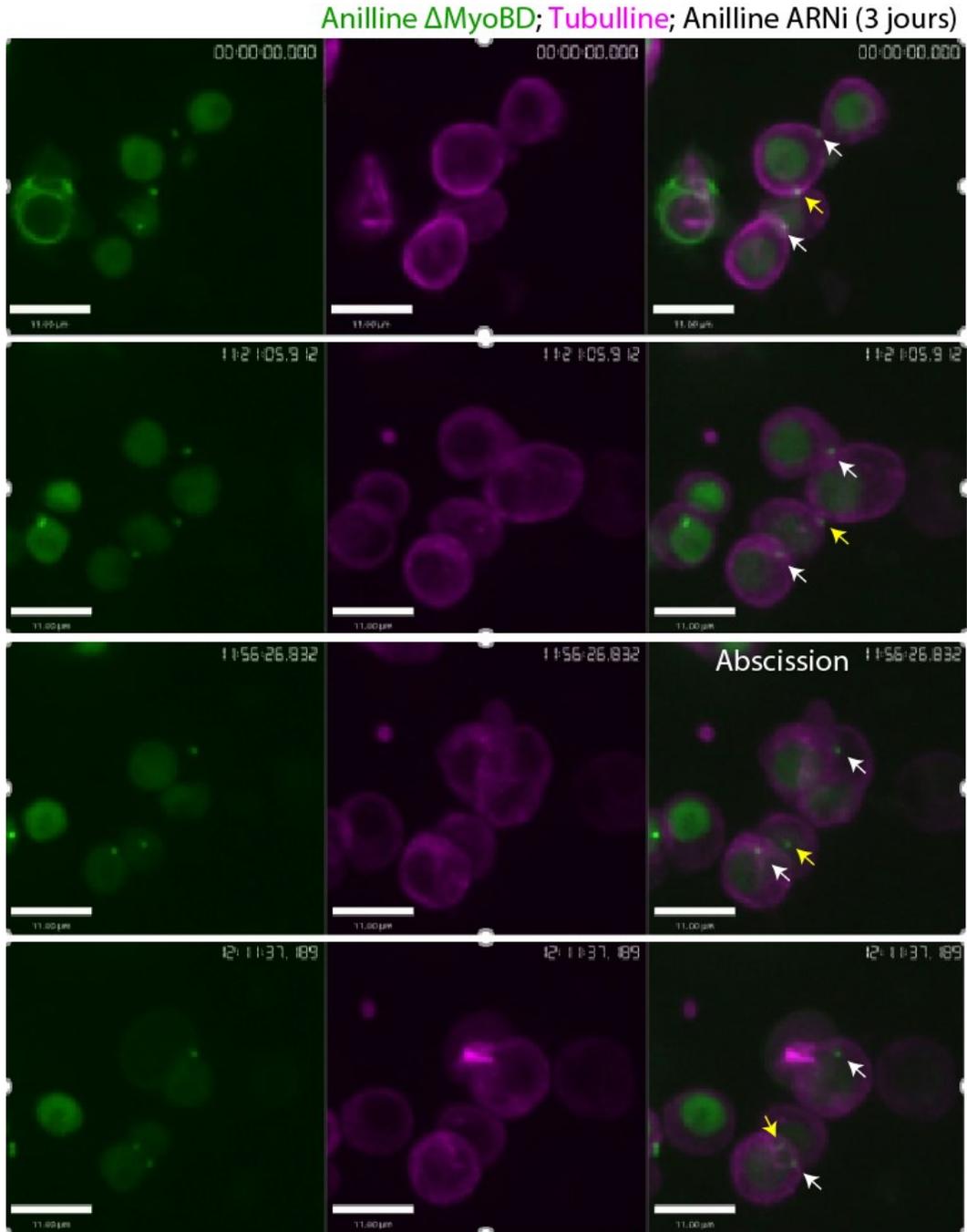


Figure 33 : L'abscission ne survient qu'au début de la prochaine division cellulaire chez certaines cellules exprimant l'anilline- Δ MyoBD.

Images d'une séquence de time-laps montrant le recrutement de l'anilline- Δ MyoBD-GFP, co-exprimé avec Tubulline-mCherry lors de la cytokinèse. Les flèches blanches montrent les AM formés le plus récemment. Les flèches jaunes montrent l'AM formé anciennement qui subit une abscission. Projection d'intensité maximale de 11 z confocaux (1 μ m par tranche), objectif 40x. La barre représente 11 μ m.

8.4 Test de l'anticorps Anti-P-MRLC^{Sqh} in vivo

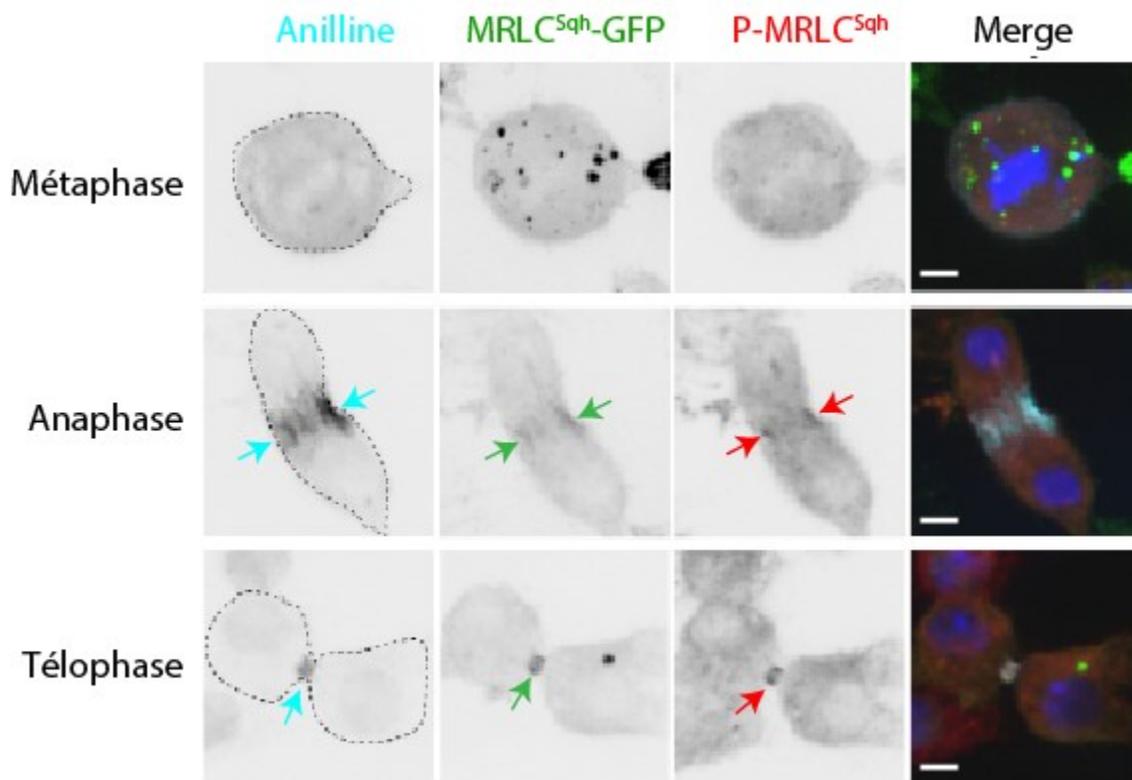


Figure 34 : L'anticorps Anti-P-MRLC^{Sqh} détecte la P-myosine-II.

Cellules S2 transfectées transitoirement avec MRLC^{Sqh}-GFP, fixées et marquées pour l'anilline (bleu pâle) et la P-MRLC^{Sqh} (rouge) avec des anticorps spécifiques. L'ADN (bleu foncé) a été marqué par le Hoechst. Les flèches montrent le recrutement au sillon de clivage et à l'AM. Projection d'intensité maximale de 11 z confocaux (1 µm par tranche), objectif 63x. La barre représente 5 µm.