

Université de Montréal

L'implication de la Cycline B dans le processus de cytocinèse

Par

Mélanie Diaz

Programme de biologie moléculaire

Faculté de médecine

Mémoire présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Maître
des sciences en biologie moléculaire

2015-11-30

© Mélanie Diaz, 2015

Résumé

Un dérèglement du cycle cellulaire peut causer le cancer. Lors de la cytokinèse un anneau contractile d'actine et de myosine se forme, se contracte, et donne un anneau du midbody qui mène à l'abscission. Le processus de cytokinèse est sous le contrôle de protéines telles que la GTPase Rho qui active la cytokinèse et les cyclines-Cdks qui l'inhibent. La *Drosophile* possède 3 cyclines mitotiques CycA/ CycB/ CycB3 qui sont successivement dégradées en fin de mitose et permettent l'initiation de la cytokinèse. La dernière étape d'abscission est un phénomène qui reste encore peu connu. Les protéines Vps4 et CHMP4C liées à ANCHR vont, sous la dépendance de la kinase Aurora B, promouvoir l'abscission mais, suite à quelques études récentes, il semble y avoir une implication de la cycline B. Ici, le but était de tester l'implication de cette cycline dans les processus de cytokinèse et d'abscission, elle a été menée par microscopie à haute résolution en temps réel avec des cellules S2 de l'organisme *Drosophila melanogaster* par le suivi de protéines recombinantes fluorescentes. L'étude a été divisée en deux axes : gain et perte de fonction par l'intermédiaire respectivement de la protéine Cycline B recombinante stable, non dégradable (CycB^{stable}-GFP) et l'inhibition par l'utilisation d'ARN double brin (ARNdb) sur l'endogène. La CycB^{stable}-GFP a perturbé la cytokinèse en induisant plusieurs anneaux contractiles et midbodies. En revanche la réduction de l'expression de CycB n'a pas eu d'effet observable, et elle ne semble pas avoir d'action sur l'abscission malgré le recrutement de CycB-GFP au midbody tardif. En revanche la protéine Cdk1 semble avoir un rôle dans l'abscission puisque sa réduction d'expression a induit un délai. Elle a donc une implication potentielle sur la cytokinèse.

Mots clés : Cycline, Cytokinèse, anneau contractile, midbody, Abscission.

Abstract

Dysregulation of the cell cycle can cause cancer. During cytokinesis a contractile ring of actin and myosin forms, contracts and gives rise to a midbody ring which controls abscission. The process of cytokinesis is controlled by proteins such as the Rho GTPase, which activates cytokinesis and cyclin-Cdks that inhibit cytokinesis. *Drosophila* has 3 mitotic cyclins CycA, CycB and CycB3, which are successively degraded at the end of mitosis to allow the initiation of cytokinesis. The last step of abscission is a phenomenon that is still obscure. The ESCRT-III components VPS4 and CHMP4C protein linked to ANCHR will, in an Aurora B kinase-dependent manner, promote abscission with recent studies implicating Cyclin B at this stage. Here, the aim was to test the role of cyclin B in cytokinesis and abscission, using real-time, high resolution microscopy of *Drosophila melanogaster* S2 cells expressing recombinant fluorescent proteins. This study was divided into two parts: gain and loss of function studies respectively using stable non-degradable cyclin B (CycB^{stable}-GFP) and inhibition by using CycB double-stranded RNA (dsRNA). The CycB^{stable}-GFP perturbed cytokinesis by inducing multiple contractile rings and midbodies. However CycB depletion had no detectable effect on the progression of cytokinesis nor on abscission despite the recruitment of CycB-GFP to the late midbody. In contrast, the protein Cdk1 seemed to play a role in abscission, since its depletion induced a delay. It therefore has potential implications for cytokinesis.

Keywords : Cyclin, Cytokinesis, Contractile ring, Midbody, Abscission

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract	ii
Table des matières	iii
Listes des tableaux	v
Liste des figures	vi
Liste des abréviations	viii
Remerciements.....	ix
1 Introduction.....	1
1.1 La division cellulaire	1
1.1.1 Le cycle cellulaire.....	1
1.1.2 La mitose	2
1.2 La cytokinèse	5
1.2.1 La formation et la contraction de l’anneau de cytokinèse	5
1.2.2 L’abscission	10
1.3 La régulation du cycle cellulaire	14
1.3.1 Les points de contrôle.....	14
1.4 Les Kinases dépendantes des cyclines.....	18
1.5 Les cyclines.....	18
1.5.1 Les cyclines mitotiques.....	21
1.6 Les organismes modèles	24
2 Projet de recherche.....	25
3 Matériels et méthodes.....	27
3.1 Les constructions	27
3.2 Les lignées cellulaires	28
3.3 Génération d’ARN double brin interférents.....	29
3.4 Microscopie	31
3.5 Immuno-buvardage de type western	32
3.6 Inhibition de Cdk1.....	34

4	Résultats.....	36
	4.1 Localisation de la CycB-GFP au midbody précoce et CycB-GFP stable au midbody tardif.....	36
	4.2 La cycline B et l’anneau contractile.....	38
	4.2.1 La cycline B stable augmente les temps de contractions de l’anneau et de la distance de ségrégation chromosomique.....	38
	4.2.2 Réduction du niveau d’expression de la Cycline B endogène après traitement à l’ARNdb.....	43
	4.2.3 La réduction d’expression de la CycB endogène ne modifie pas le temps de contraction de l’anneau et la distance de ségrégation chromosomique.....	45
	4.3 La cycline B et l’abscission.....	50
	4.3.1 La CycB-GFP a un comportement dynamique au midbody tardif.....	50
	4.3.2 La réduction d’expression de la Cycline B endogène ne change pas le temps d’abscission.....	52
	4.3.3 L’inhibition de Cdk1 provoque un délai dans le temps d’abscission.....	54
	4.3.4 La réduction d’expression de toutes les cyclines mitotiques ne change pas le temps d’abscission.....	59
5	Discussion.....	62
	5.1 Localisation de la CycB-GFP au midbody tardif en présence de la boîte de destruction.....	62
	5.2 La CycB-GFP promeut le processus normal de contraction mais n’est pas indispensable.....	65
	5.2.1 La stabilisation de la CycB a un effet de frein sur la cytokinèse.....	65
	5.2.2 La réduction d’expression de la Cycline B endogène n’a pas d’effet sur la cytokinèse.....	67
	5.3 La CycB-GFP n’a pas d’effet apparent sur l’abscission.....	69
	5.4 La CycB-GFP promeut le processus normal de contraction mais n’est pas indispensable.....	70
	5.5 Perspectives et futures expériences.....	71
6	Conclusion.....	73
7	Bibliographie.....	74
	Annexe.....	81

Liste des tableaux

Tableau 1 Séquences des amorces d'hybridations pour la construction de protéines recombinantes.....	28
Tableau 2 Plasmides utilisés lors de la création de souches.....	28
Tableau 3 Souches S2 transfectées et utilisées au cours de cette étude	29
Tableau 4 Séquences des amorces d'hybridations pour la construction des ARNdb.....	30
Tableau 5 Conditions réalisées lors de l'immuno-buvardage de type western	34
Tableau 6 Souches transfectées pour de futures expériences	82
Tableau 7 Séquences des amorces d'hybridations pour la construction des ARNdb pour de futures expériences	83

Liste des figures

Figure 1 Cycle cellulaire eucaryote	2
Figure 2 Etape de la mitose	3
Figure 3 Formation du fuseau mitotique	4
Figure 4 Séparation du cytoplasme, mise en place de l’anneau contractile	6
Figure 5 Réseau d’interaction possible entre les protéines impliquées dans le processus de cytokinèse	7
Figure 6 Représentation de l’assemblage de l’anneau contractile.....	8
Figure 7 Organisation du midbody	10
Figure 8 Modèle d’action de l’abscission en cellule humaine	12
Figure 9 La CycB endogène localise au fuseau et au midbody.....	13
Figure 10 Localisation de la CycB au midbody dans des cellules HeLa	14
Figure 11 Représentation du point de contrôle à la transition métaphase/anaphase	17
Figure 12 Distribution des cyclines chez les organismes eucaryotes	19
Figure 13 Régulation du cycle cellulaire chez la Drosophile et niveau des cyclines à l’étape de mitose, cytokinèse et abscission	20
Figure 14 Phénotypes des embryons en présence de Cyclines stables ou de mutant négatif....	23
Figure 15 Construction utilisées au cours de l’étude.....	31
Figure 16 Présence de CycB-GFP au midbody tardif et CycB ^{stable} -GFP au midbody	37
Figure 17 Temps de mitose augmenté en présence de CycB ^{stable} -GFP induite	39
Figure 18 Phénotypes de « bulles » lors de la contraction de l’anneau en présence de CycB ^{stable} -GFP	40

Figure 19 Temps de contraction de l'anneau augmenté en présence de CycB ^{stable} -GFP induite	41
Figure 20 La présence de CycB ^{stable} -GFP induite augmente la distance et le temps de ségrégation des chromosomes	42
Figure 21 Réduction du niveau d'expression de Cycline B endogène en présence l'ARNdb .	44
Figure 22 Pas de différence de temps de mitose en présence d'ARNdb contre la Cycline B endogène.....	45
Figure 23 La perte de fonction de la cycline B endogène ne modifie pas le temps de contraction de l'anneau.....	47
Figure 24 La perte de fonction de la cycline B endogène ne modifie pas la distance de ségrégation chromosomique en fonction du temps	48
Figure 25 Comportement dynamique de la CycB au midbody	51
Figure 26 Temps d'abscission non modifié en présence d'ARNdb CycB.....	53
Figure 27 Le temps d'abscission varie en présence d'inhibiteur de Cdk1	55
Figure 28 Le temps d'abscission varie en présence d'inhibiteur de Cdk1 sur souche avec CycB ^{stable} -GFP et CycB-GFP	58
Figure 29 Faible taux de division en absence de CycA.....	60
Figure 30 Le temps d'abscission ne varie pas en présence d'ARNdb des cyclines mitotiques	61

Liste des abréviations

ADNase : Désoxyribonucléase

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ANCHR : Abscission/NoCut checkpoint regulator

ARNdb : Acide ribonucléique double brin

ARNm : Messenger ribonucleic acid

APC : Anaphase-promoting complex

Cdks : Cyclin-dependent kinases

CENP-E : Centromere protein E

CHMP4C : Multivesicular body protein 4C

CycB : Cycline B

DB200 : 200 first amino acids of destruction box

DMSO : Dimethyl sulfoxide

DTT : Dithiothreitol

ESCRT-III : Endosomal Sorting Complex Required for Transport III

FRAP : Fluorescence recovery after photobleaching

GAP : GTPase-activating protein

GEF : Guanine nucleotide exchange factor

GFP : green fluorescent protein

KIF4 : microtubule-based motor protein 4

mCh : mCherry

MKLP : Mitotic kinesin-like protein

ORF : Open reading frame

PCR : Polymerase chain reaction

Plk1 : Polo-like kinase 1

PRC1 : Protein regulator of cytokinesis 1

SAC : Spindle assembly checkpoint

UTR : Untranslated region

VPS4 : Vacuolar protein sorting-associated protein

Remerciements

Je tiens particulièrement à remercier mon directeur de stage, Gilles Hickson pour son implication, sa disponibilité et l'intérêt qu'il porte à chaque étudiant. J'ai pu apprendre à développer un réel esprit scientifique et d'analyse durant cette expérience.

Je remercie également tous les membres du laboratoire, Silvana Jananji pour ces précieux conseils et le temps passer à expliquer chaque expérience. Nour-El Amine pour son calme incroyable, les heures passées à m'expliquer la microscopie et les westerns blot. Amel Kechad pour ses explications et le temps qu'elle a prit pour discuter dans les moments de doute. Zlatina Drageiva pour son soutien et l'ambiance qu'elle pouvait mettre au laboratoire. Yvonne Ruella pour sa bonne humeur à toute épreuve.

Je remercie aussi l'hôpital sainte-Justine pour son accueil et les laboratoires du Dr. H. Maiato et du Dr. S. Campbell pour les constructions envoyées.

1 Introduction

1.1 La division cellulaire

Le vivant est divisé en trois grands domaines nommés : Archées, Procaryotes et Eucaryotes. Ce dernier domaine a la particularité de présenter une vaste diversité d'organismes allant de la levure unicellulaire à l'Homme et la plante pluricellulaires, sur la base d'une structure cellulaire commune. En effet les cellules eucaryotes possèdent un vrai noyau, celui-ci renferme l'information génétique sous forme de chromosomes et permet le maintien de l'intégrité génomique. Ces cellules vont suivre un cycle bien précis qui permet leur division et donc leur reproduction, il est retrouvé dans tous les organismes eucaryotes, seul les différentes phases de ce cycle diffèrent.

1.1.1 Le cycle cellulaire

Ces organismes eucaryotes se divisent par un mécanisme processif extrêmement conservé et réparti en 4 phases (G1, S, G2 et M) qui définissent le cycle cellulaire (Cooper, 2000) (figure 1). Un dérèglement lors de ce cycle peut entraîner des dérégulations et mutations pouvant amener à une prolifération anarchique des cellules et déclencher des cancers.

La première phase du cycle est la phase G1 qui fait partie de l'interphase. C'est une étape de croissance et de synthèse d'ARNm et de protéines requis pour la synthèse d'ADN qui a lieu en phase S. Cette phase suivante va permettre à l'ADN de se répliquer et former les chromosomes, c'est une étape très régulée et très conservée chez les eucaryotes. Vient ensuite la phase G2 ou phase pré-mitotique, elle est la deuxième partie de l'interphase et précède la mitose. Cette dernière phase correspond à la ségrégation des chromosomes, puis la séparation des cytoplasmes lors de la cytokinèse pour aboutir enfin à l'abscission qui est la séparation physique des deux cellules filles. Elles vont avoir en commun le même bagage génétique que la cellule mère.

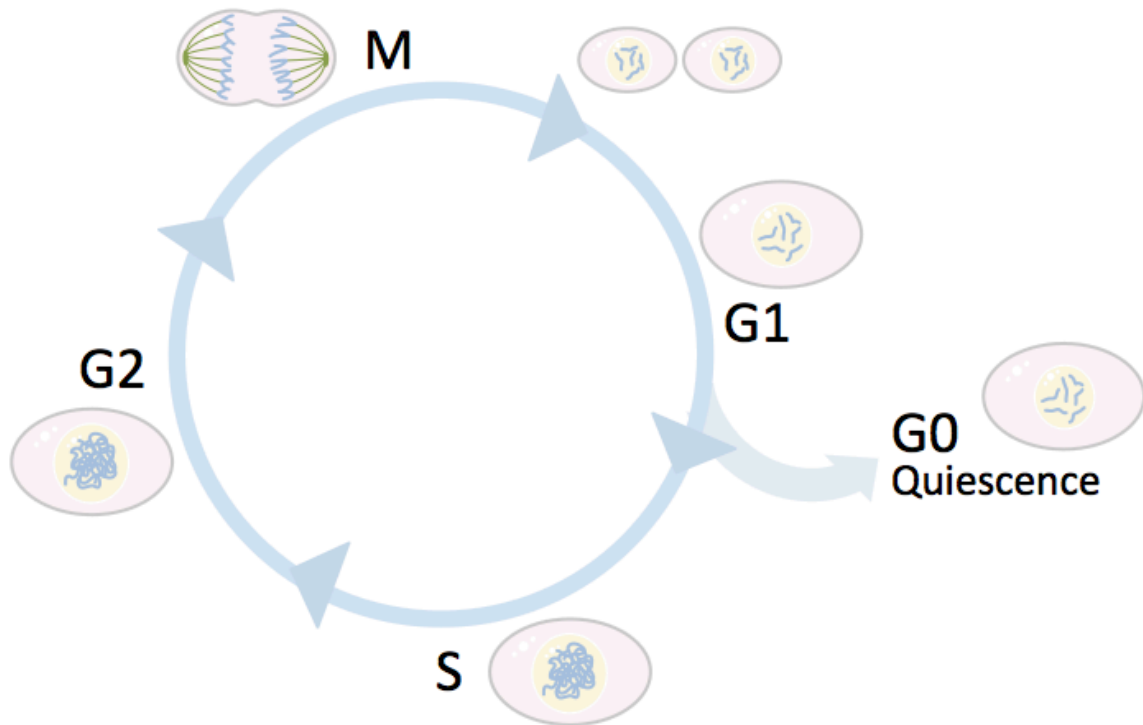


Figure 1 : **Cycle cellulaire eucaryote.** Le cycle cellulaire est divisé en 4 phases : G1, S, G2 et M. L'étape de mitose correspond à la ségrégation des chromosomes et la séparation du cytoplasme.

1.1.2 La mitose

Elle correspond à la ségrégation des chromosomes et à la séparation du cytoplasme et va donner deux cellules filles identiques.

La mitose est divisée en 5 étapes (figure 2) plus une dernière étape qui est la cytokinèse (figure 4).



Figure 2 : **Etape de la mitose** – Ségrégation des chromosomes : Prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télophase. Les chromosomes sont représentés en bleu, le fuseau mitotique et les centrosomes en vert.

- La prophase

La première étape de prophase correspond à la condensation des chromosomes par le recrutement de complexe protéique cohésine et condensine, au désaggrégement de l'enveloppe nucléaire et à la mise en place des centrosomes aux pôles du fuseau

- La prométaphase

Elle correspond à la mise en place du fuseau mitotique. A partir des centrosomes situés aux pôles de la cellule des microtubules vont se polymériser et se dépolymériser via des sous-unités alpha et beta de tubuline. Il existe 3 types de microtubules (fig 3). Les microtubules kinétochoriens, polaires et astraux :

- Les microtubules kinétochoriens partent des centrosomes par leurs extrémités moins se polymérisent et vont s'attacher aux chromatides et plus précisément à leurs kinétochores par leur extrémité plus. Ils sont très dynamiques et ont un mouvement d'oscillation jusqu'à attraper les kinétochores sur plusieurs points d'attachement et maintenir une mise sous tension équilibrée. Cette étape est très régulée par les cyclines A et B (Kabeche and Compton, 2013).
- Les microtubules polaires suivent un axe semblable aux microtubules kinétochoriens et permettent la mise en place du fuseau et le maintien de la structure.
- Les microtubules astraux ont une direction des centrosomes vers la membrane et se lient à elle. Ils permettent un éloignement des centrosomes de la membrane et également un maintien de la structure.

- La métaphase

Elle correspond à l'attachement et la mise sous tension des chromosomes sur le plan équatorial. Ils vont être correctement positionnés après le phénomène d'attachement, détachement au niveau des kinétochores. Une fois correctement positionnés l'anaphase prend place.

- L'anaphase

Elle correspond au clivage du complexe de cohésine et condensine qui lie les deux chromatides sœurs et permet la séparation de celles-ci et la migration vers les pôles cellulaires opposés. Plusieurs modèles de dépolymérisation sont envisagés à ce stade.

- La télophase

Elle correspond à la décondensation des chromosomes aux pôles et à la nouvelle formation de l'enveloppe nucléaire.

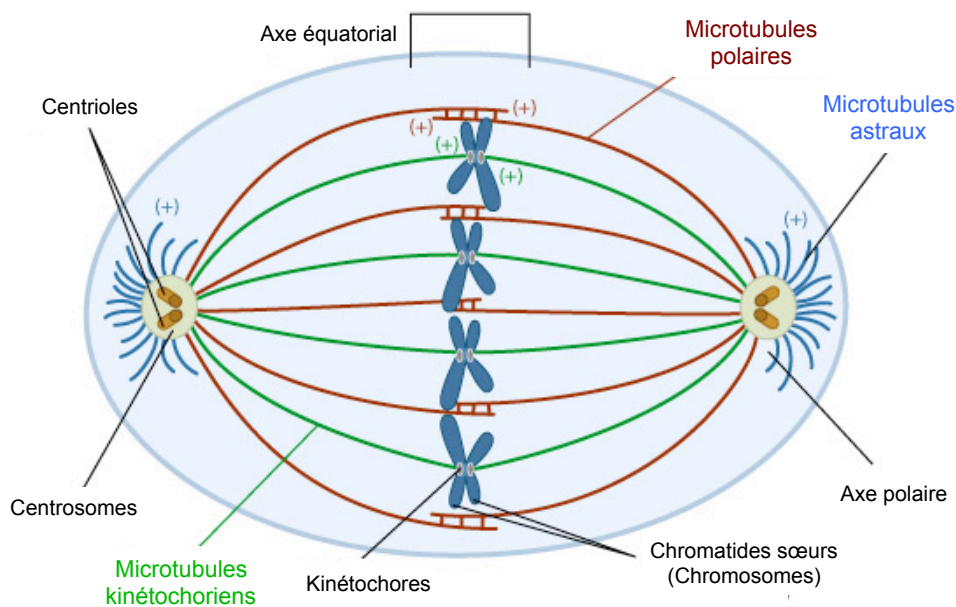


Figure 3 : **Formation du fuseau mitotique.** Représentation des différents microtubules, kinétochoriens, astraux et polaires durant la métaphase. Adapté de (Dept. Biol. Penn State © 2004).

L'étape de la ségrégation des chromosomes agit en synergie avec l'étape de formation et contraction de l'anneau de cytokinèse. Ces étapes sont primordiales et critiques pour la cellule puisqu'elles sont très rapides et en cas de dérégulation ces phénomènes peuvent induire de nombreux problèmes ; clivage d'ADN, fermeture asymétrique, dérégulation du cycle suivant, jusqu'à la division anarchique, au cancer. La compréhension profonde de cette étape de cytokinèse via la formation, la contraction de l'anneau jusqu'à l'abscission, est donc capitale.

1.2 La cytokinèse

1.2.1 La formation et la contraction de l'anneau

La cytokinèse est la séparation physique des cytoplasmes. Elle démarre à la transition métaphase/anaphase avec la mise en place de l'anneau contractile et par la formation d'un midbody qui est la dernière entité à relier les deux cellules filles, elle termine par le processus d'abscission qui séparent physiquement les deux cellules filles (Cabernard, 2012) (figure 4).

Cette étape de transition, métaphase/anaphase est un moment clé car c'est à ce moment que la mise en place de l'anneau contractile se fait. Durant cette transition le fuseau mitotique participe au recrutement et à la mise en place de cet anneau. Il est donc essentiel que les microtubules soient correctement mis en place (structure détaillée en amont).

De plus, durant cette transition il y a une levée du point de contrôle spécifique Métaphase/Anaphase et une séparation du complexe de CycB^{CycB1}/Cdk1 par la dégradation de la Cycline B et donc inactivation de Cdk1 (Peters, 2002), au cours de ce processus la protéine Aurora B est également essentielle. Ces protéines permettent la bonne mise en place des chromosomes, la bonne mise sous tension par le bon attachement. Cette levée va donc permettre la ségrégation des chromosomes et donc le démarrage de la cytokinèse.

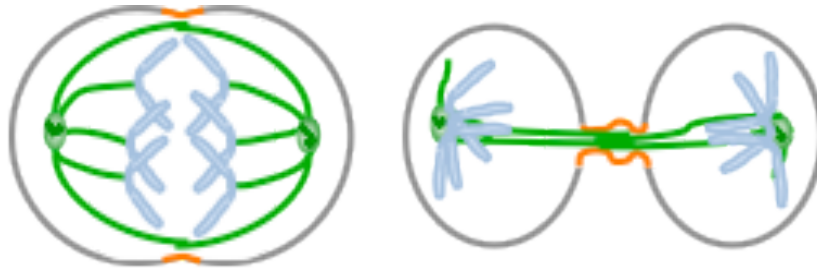


Figure 4 : **Séparation du cytoplasme, mise en place de l'anneau contractile.** Contraction de l'anneau et formation du midbody en orange de la transition métaphase/anaphase à la cytokinèse.

Lors de la formation de l'anneau contractile la cellule va tout d'abord déterminer la position correcte de cette structure. Grâce à un démarrage par une mise en place d'une signalisation entre le fuseau par les microtubules polaires et le cortex cellulaire (Devore, Conrad et al. 1989) l'anneau va se former au cortex équatorial de la cellule entre la zone de séparation des chromosomes (Somers and Saint, 2003). Le détail du recrutement des protéines spécifiques à l'anneau reste encore obscur. Chez de nombreux organismes notamment le *Xenopus* et la *Drosophila* il est connu que ce sont les GTPases Rho activées à l'équateur qui régulent le recrutement des protéines. Ces GTPases sont sous le contrôle de régulateurs situés sur les microtubules à l'équateur. Pavarotti^{MKLP-1} (famille des kinésines-6), les protéines GAP dont Tum^{MRacGAP} (protéine activateur de GTPase) et le facteur d'échange nucléotidique Pebble^{GEF} (Mishima et al., 2002; Somers and Saint, 2003).

Pebble^{GEF} va stimuler l'activité de Rho et donc le recrutement, avec Tum ils participent au flux de GTPase et l'activation/inactivation de Rho (Zavortink et al., 2005). De plus, la protéine Polo kinase Plk1 a un rôle dans son accumulation (Kachaner et al., 2014; Petronczki et al., 2007). Et la kinésine-6/Pavarotti qui lie les kinésines et la myosine chez la *Drosophila* va réguler le regroupement des microtubules (Vale et al., 2009). Ces facteurs vont coordonner la formation de l'anneau (Fededa and Gerlich, 2012). Cependant d'autres travaux ont suggéré que les microtubules astraux auraient un effet inhibiteur induisant une relaxation au niveau du cortex polaire et donc favoriseraient la contraction équatoriale (Miller, 2011), de plus, les

microtubules astraux appuieraient ce phénomène car ils pourraient avoir un effet négatif sur tout le cortex de la cellule sauf à l'équateur (White and Rao, 1983).

Cette protéine, Rho-GTP activée va favoriser l'assemblage des filaments d'actines au cortex par l'action des formines comme Diaphanous, elle va favoriser également l'assemblage de la myosine par la kinase ROCK (Sit and Manser, 2011; Watanabe et al., 1999). La kinase ROCK va phosphoryler la chaîne légère de myosine et permettre l'assemblage en filament tout en inhibant l'action de phosphatase de myosine (Amano et al., 2010)

De nombreuses autres protéines sont recrutées à cet anneau contractile. La Profiline et la Cofiline vont respectivement promouvoir l'élongation et la déstabilisation des filaments d'actine (Chen and Pollard, 2011). L'Anilline est une des protéines centrales de cet anneau, c'est une protéine d'échaffaudage qui lit la F-actine, la myosine, les septines, Rho et Tum (D'Avino et al., 2008; Piekny and Glotzer, 2008). Elle permet l'organisation de l'anneau et son attachement à la membrane plasmique. Les septines sont également essentielles, elles vont stabiliser l'anneau en limitant la propagation du sillon de clivage (fig 5) (Founounou et al., 2013).

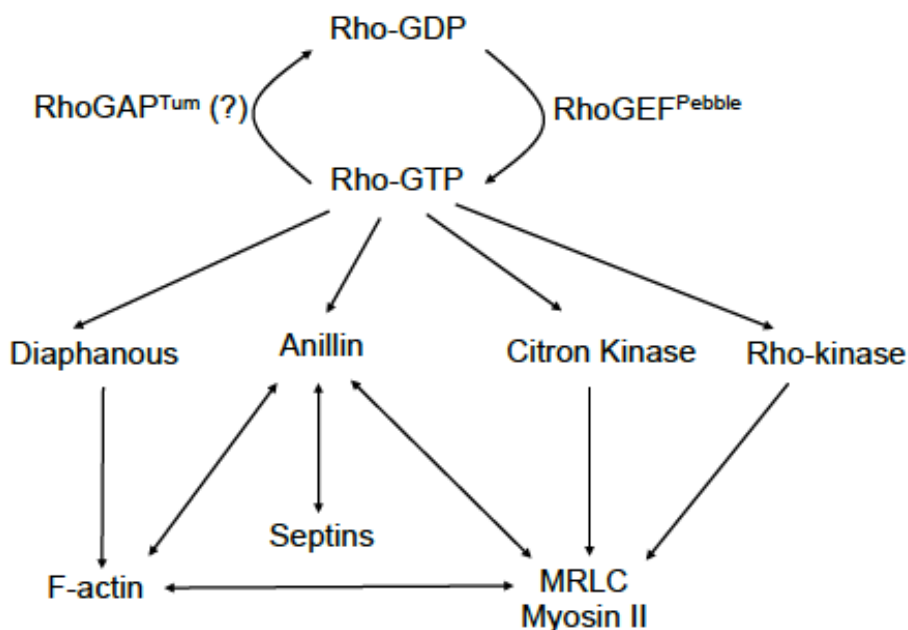


Figure 5 : Réseau d'interaction possible entre les protéines impliquées dans le processus de cytokinèse. Les protéines en amont ; Pebble et Tum vont exercer un roulement d'état actif non actif à RhoA qui elle à l'état active va recruter les protéines Diaphanous, Anilline, la

kinase citron et les kinase Rho qui plus en aval vont recruter les protéines septines et d'actine, myosine pour former l'anneau contractile.

Une fois formée l'anneau va se contracter. Classiquement dans le modèle de contraction les filaments de myosine grâce à leurs activités motrices vont se déplacer, « glisser » entre les filaments d'actine (Reymann et al., 2012; Zemel and Mogilner, 2009) et réduire la taille de l'anneau (Mendes Pinto et al., 2012). De plus, lors de cette contraction il semble y avoir un équilibre de polymérisation/dépolymérisation de la F-actine pour maintenir une épaisseur d'anneau constante (fig 6) (Rappaport, 2005).

Des constats réalisés sur cellules de mammifères et de levures indiquent une structure très dynamique du complexe myosine/actine avec un « turn-over » important (Guertin et al., 2002). En revanche chez l'organisme *Caenorhabditis elegans* indiquerait un désassemblage progressif de l'anneau (Miller, 2011).

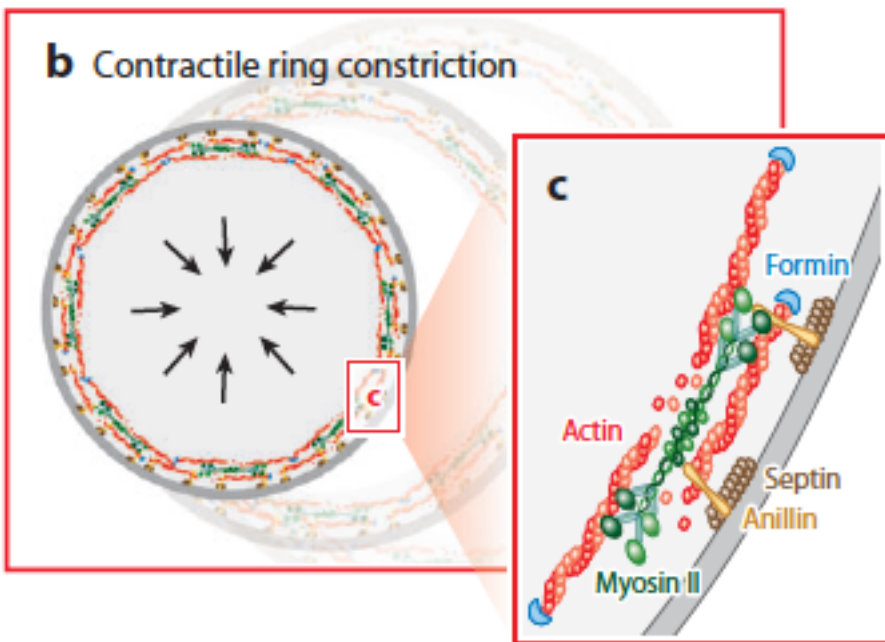


Figure 6 : **Représentation de l'assemblage de l'anneau contractile.** Réseau d'Actine, Myosine, Anilline et Septine, Formine. Le modèle de contraction se ferait par un glissement entre l'actine et la myosine (Green et al., 2012).

Suite à la contraction de cet anneau il y a formation d'un anneau du midbody et d'un corps du midbody (Kechad et al., 2012). Il est la dernière entité à relier les deux cellules filles. Sa première fonction est de localiser le site d'abscission. Malgré son importance sa structure reste encore mal connue. Sa composition change au cours de sa maturation. Lors du compactage un renflement se développe au centre du midbody (El Amine et al., 2013; Hu et al., 2012) Il apparaît trois structures ; le corps du midbody et la région flanquée qui bordent le corps. Ce renflement va être entouré par l'anneau du midbody (fig 7).

- Le corps du midbody correspond à la zone violette de la figure 7.a. Cette région est constituée de protéines, KIF4 et PRC1 qui lient les microtubules imbriqués dans cette zone, des protéines non spécifiques sont présentes aussi et se lient au cytosquelette, sont impliquées dans le réseau lipidique et le trafic vésiculaire.
- La zone flanquée va être constituée de MKLP2, CENP-E et Aurora B.
- L'anneau du midbody (en rouge figure 7.b) entourant le corps est constitué de Pebble, RhoA, ARF6, Cep55, Citron kinase, septines, Anilline. Cette dernière est essentielle à l'assemblage du midbody et de son encre à la membrane. En cas de réduction d'expression ou sans sa partie C-term qui lie les septines, les cellules forment de grands ponts intercellulaires qui mènent à un crash de la cytokinèse (Kechad et al., 2012).

Les structures du midbody core en violet et de l'anneau du midbody en rouge apparaissent dense aux électrons et empêchent les anticorps de se lier car elles sont très compactes et ne permettent pas des analyses poussées sur sa composition (Hu et al., 2012).

Une fois mature il va y avoir coupure d'un des deux côtés ou des deux côtés du midbody par l'abscission, il sera soit gardé par une des cellules filles ou largué dans le milieu (Mullins and Biesele, 1977).

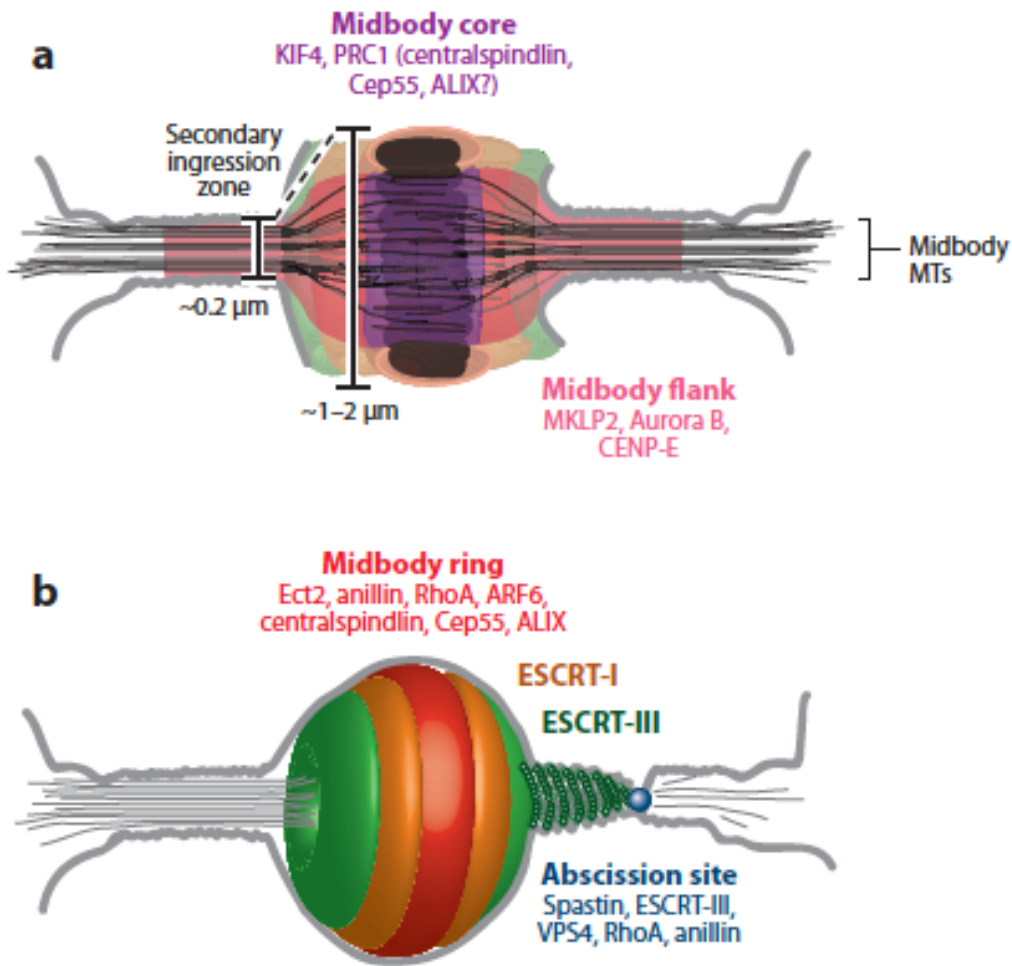


Figure 7 : **Organisation du midbody.** (a) Le corps du midbody en violet comportant les protéines KiF4 et PRC1 et la région flanquée en rose contenant les protéines MKLP2, Aurora B et CENP-E et (b) l’anneau du midbody en rouge entouré des régions clés de l’abscission avec les protéines ESCRT-I et III en vert et le site d’abscission monolatéral en bleu contenant notamment avec la protéine VPS4.

1.2.2 L’abscission

L’abscission est la dernière étape du cycle cellulaire et du processus de cytokinèse. Elle démarre après la maturation du midbody jusqu’à la séparation physique des deux cellules filles. Elle fait intervenir un autre réseau protéique que la cytokinèse (Steigemann and Gerlich,

2009). Comme il a été décrit plus haut le midbody mature présente une structure compacte constituée de microtubules et des protéines (Elad et al., 2011).

L'événement final d'abscission de la membrane est essentiellement régulé par les protéines ESCRT-III Shrb^{CHMP4B} et Vps4. ESCRT-III par sa sous-unité CHMP4C va polymériser et former un polymère en spirale associé à la membrane. Chez l'Homme il existe 7 principales protéines ESCRT-III alors que chez la Drosophile il y en a 3 avec la sous-unités Shrub (Sweeney et al., 2006; Vaccari et al., 2009). L'accumulation de l'ESCRT-III au site d'abscission coïncide avec une perte brusque des microtubules du midbody (Green et al., 2012).

La deuxième protéine clé de l'abscission est Vps4, c'est une AAA-ATPase qui peut conduire la coupure (Wollert et al., 2009). Les modèles chez les vertébrés prévoient un regroupement de cette protéine (Neto and Gould, 2011). Elle est la toute dernière à se rendre sur le site d'abscission, elle va être recrutée par l'ESCRT-III et provoquer son désassemblage (Morita et al., 2010). Elle participe à la fission de la membrane et à la formation de vésicules intracellulaire (dans le cas des corps multivésiculaires) ou extracellulaire comme les vésicules virales mais dans le processus de l'abscission son mécanisme exact est encore mal connu (Hill and Babst, 2012).

L'abscission est un processus très régulé dans le temps et l'espace (fig 8). Il nécessite un point de contrôle pour éviter, lors de pont chromosomique, la coupure de l'ADN ou l'induction de mutation et donc l'accumulation de dommages à l'ADN. Des études menées sur des cellules de levure à fission et de mammifères ont identifiées un point de contrôle nommé « NoCut pathway » régulé par la kinase Aurora B qui provoque un délai dans l'abscission dans des cellules avec des défauts de ségrégation (Norden et al., 2006; Steigemann et al., 2009). Le modèle d'abscission chez les mammifères présente une rétention de la protéine Vps4 par les protéines ANCHR et CHMP4C sur l'anneau du midbody. Aurora B prévient l'abscission en phosphorylant la région C-term de l'ESCRT-III (CHMP4C). En condition de ségrégation normale, à la sortie de mitose, la dégradation d'Aurora B lève probablement cette inhibition, libère l'ESCRT-III qui libère Vps4 qui rejoint la zone d'abscission et permet la coupure (Thoresen et al., 2014).

Chez la *Drosophile* peu de données sont connues sur l'abscission. Certaines études sur des embryons de *Drosophile* montrent une action indispensable de la protéine Shrb^{CHMP4B} pour une bonne abscission (Matias et al., 2015). De plus elles démontrent une régulation négative de Shrb^{CHMP4B} par Aurora B durant l'abscission (Matias et al., 2015).

Le timing de ce processus est donc dicté par l'inactivation de la kinase Aurora B mais également Plk1. La kinase Plk1 à la mitose phosphoryle Cep55 qui ne peut s'associer au fuseau et au midbody mais lorsque Plk1 est dégradée à la sortie de mitose, Cep55 est recruté au midbody et permet le recrutement des ESCRT (Bastos and Barr, 2010). L'abscission peut être très longue et chevaucher d'autres phases du cycle et durer jusqu'en phase S du cycle suivant.

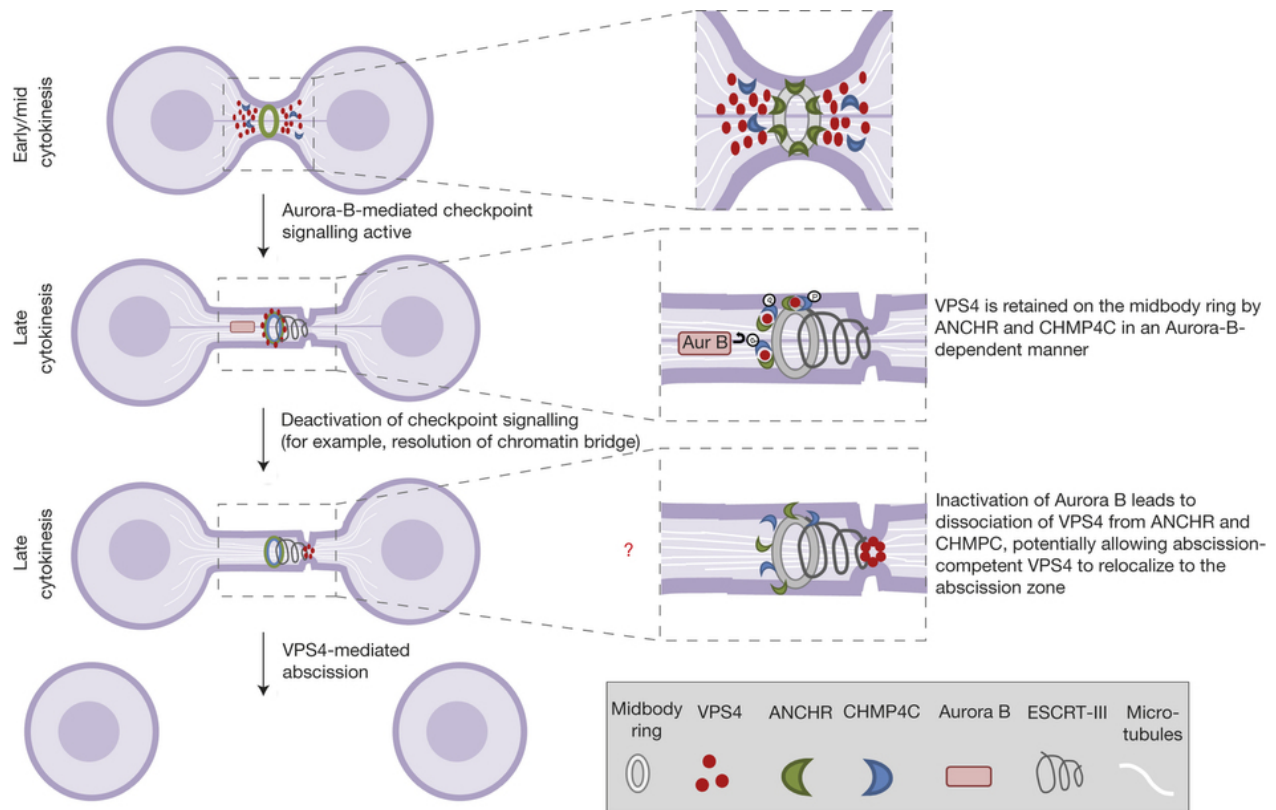


Figure 8 : **Modèle d'action de l'abscission en cellules humaine.** Après fermeture de l'anneau la protéine ESCRT-III va former une spirale à partir de celui-ci. Avant l'abscission VPS4 est capturée par les protéines ANCHR et CHMP4C et phosphorylée par Aurora B. Au moment de l'abscission il y a inactivation d'Aurora B, déphosphorylation de VPS4. Sa libération va l'amener au site d'abscission pour la coupure (Thoresen et al., 2014).

Une étude récente sur les chambres à oeufs de *Drosophile* présente un pool de CycB-GFP accumulé au midbody durant la cytokinèse tardive, constatation réitérée avec la CycB endogène. De plus, il a été démontré une phosphorylation de la CycB notamment sur son site S157 par la protéine Aurora B. Ces deux protéines auraient une activité antagoniste dans les cellules germinales de l'organisme *Drosophile* (fig 9) (Mathieu et al., 2013).

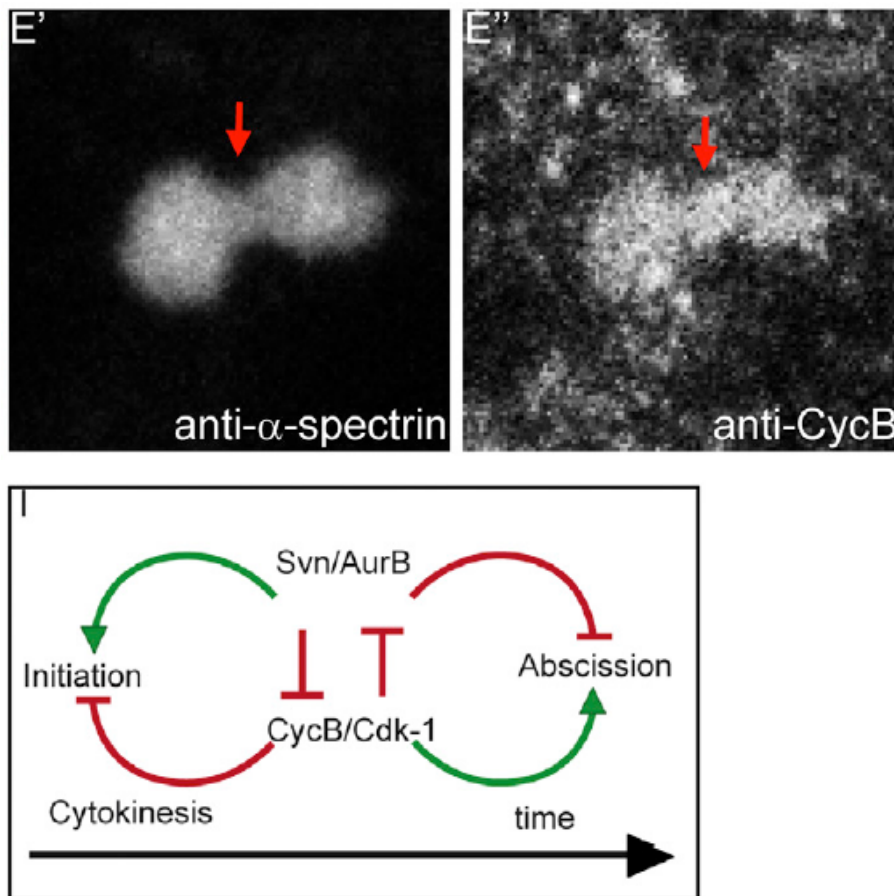


Figure 9 : **La CycB endogène localise au fuseau et au midbody** (indiqué par les flèches rouge E' et E'') avec l'anticorps anti-CycB. I Schéma de l'action antagoniste de la CycB et d'Aurora B chez l'embryon de *Drosophile*. (Mathieu et al., 2013).

La localisation de la CycB au midbody est également retrouvée chez les cellules HeLa (Mathieu et al., 2013) ce qui rend son implication très probable dans la régulation de ce processus (fig 10).

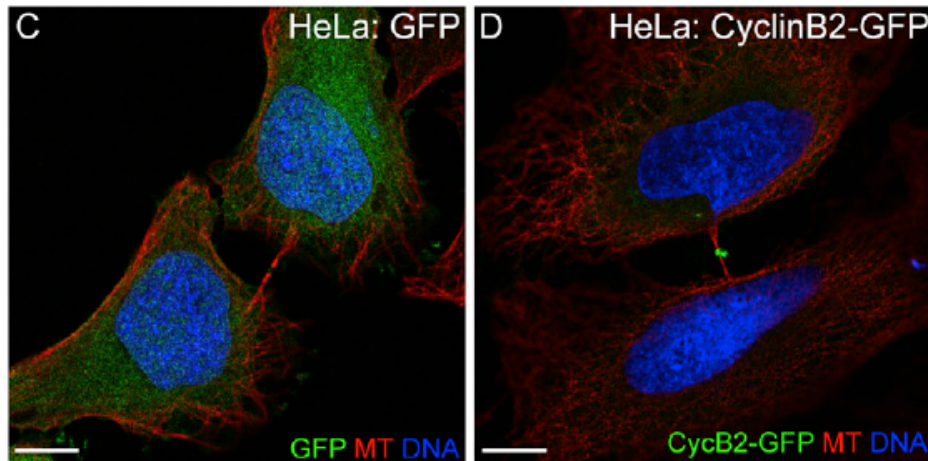


Figure 10 : **Localisation de la CycB au midbody dans des cellules HeLa.** (C et D) Section confocale des cellules HeLa transfectées avec GFP- (E) ou Cycline-B2-GFP (F), exprimant la tubuline en rouge et l'ADN en bleu (DAPI). La Cycline B2 est retrouvée au midbody.

Le cycle cellulaire et notamment le processus de cytokinèse sont régulés par points de contrôles qui agissent tout le long et permettent un bon déroulement des étapes et préviennent des dommages.

1.3 La régulation du cycle cellulaire

1.3.1 Les points de contrôle

Le cycle cellulaire est finement contrôlé et comporte un certains nombres de point de contrôle. Ces points sont nécessaires au bon déroulement du cycle et impliquent un grand nombre de réseaux et de complexes protéique. La régulation se fait essentiellement par les complexes Cdks/Cyclines, une fois activés ces complexes vont permettre la phosphorylation de substrats (Guardavaccaro and Pagano, 2006). Les niveaux d'expression des Cdks sont

constants tout au long du cycle en revanche ce sont les niveaux d'expressions des cyclines qui varient. Elles ont une expression cyclique et augmente au moment opportun pour les Cdks.

Lors de l'entrée en mitose c'est notamment la protéine Cdk1 qui va lier la Cycline B. Ce complexe est notamment régulé par 2 protéines Wee1 et Cdc25. Wee1 va phosphoryler Tyr15 et Thr14 qui inhibe l'activité de Cdk1 (Welburn et al., 2007). Cdc25, la phosphatase va déphosphoryler Cdk1 et rendre actif le complexe (Strausfeld et al., 1991) qui lui va induire un système de rétro-contrôle positif sur Wee1 et Cdc25 (Sveiczzer et al., 2000). Les protéines PP2A et Gwl sont également impliquées. PP2A va déphosphoryler un grand nombre de substrats de Cdk1 et donc contrôler de manière négative l'action de cette protéine et va participer à l'activation de Wee1 (Jeong and Yang, 2013). Gwl quand à elle va inhiber la phosphatase PP2A et promouvoir l'entrée en mitose (Hara et al., 2012).

Les chromosomes vont s'aligner correctement et être mis sous tension. Pour poursuivre le cycle et sortir de mitose les chromosomes vont être ségrégués, pour cela le point de contrôle du SAC joue un rôle important. Il est constitué de complexes protéiques comportant notamment Mad1/2, Bub1, CENP-E, cdc20 et APC. Actif, il va empêcher la poursuite du cycle par l'action du complexe Cdk/Cyc et le maintien du complexe securine/séparase. Lorsque les chromosomes sont correctement attachés le SAC devient inactif et les APC/cdc20 va induire la dégradation de la Cycline et de la securine (Malmanche et al., 2006). Il n'y a plus rien qui empêche la ségrégation. De plus, une composante adjacente mais importante va intervenir. Aurora B va agir comme gradient de phosphorylation au niveau des kinétochores et prévenir les mauvais attachements, une fois correctement attachés les kinétochores vont sortir de la zone du gradient et poursuivre la ségrégation (fig 11) (Gregan et al., 2011).

Il y a 3 points de contrôle indispensables :

- A la transition des phases G1 et S. Ce point de contrôle s'effectue à la fin de l'interphase G1. Il va contrôler si les conditions de l'environnement cellulaire (nutriments, enzymes) de la cellule sont suffisantes pour la synthèse de l'ADN. Si ce n'est pas le cas la cellule va s'arrêter et peut passer en G0. Les Cdks (Cyclines-dependent kinases) s'activent et phosphorylent les substrats pour induire la réplication de l'ADN (Foster et al., 2010).

- A la transition des phases G2 et M. Ce point peut empêcher la poursuite du cycle en mitose si la réplication de l'ADN n'est pas achevée ou présente des défauts. Il va y avoir un blocage dans le processus d'activation de Cdk1 (Raleigh and O'Connell, 2000).
 - En effet si des lésions à l'ADN sont détectées la phosphatase cdc25 (qui active Cdk1) va être inactivée par les protéines Chk1 et Chk2 (fig 11).
 - Si la réplication est inactivée c'est ATR qui va phosphoryler Chk1 et inhiber Cdk1.
 - La protéine p53 « gardien du génome » va également détecter des problèmes de réplication et va activer p21 qui lui inactive le complexe Cdks/Cycs.
- A la transition métaphase/anaphase. Les chromosomes vont s'aligner sur la plaque métaphasique. Durant l'attachement/détachement des kinétochores par les microtubules les chromatides sœurs sont liées par la cohésine et le complexe Cdk1/CycB actif va phosphoryler un grand nombre de substrat empêchant la ségrégation. A cette transition le point de contrôle du SAC (spindle assembly checkpoint) va s'inactiver. Lorsque les chromosomes sont correctement attachés le SAC devient inactif il n'y a plus rien qui empêche la ségrégation.

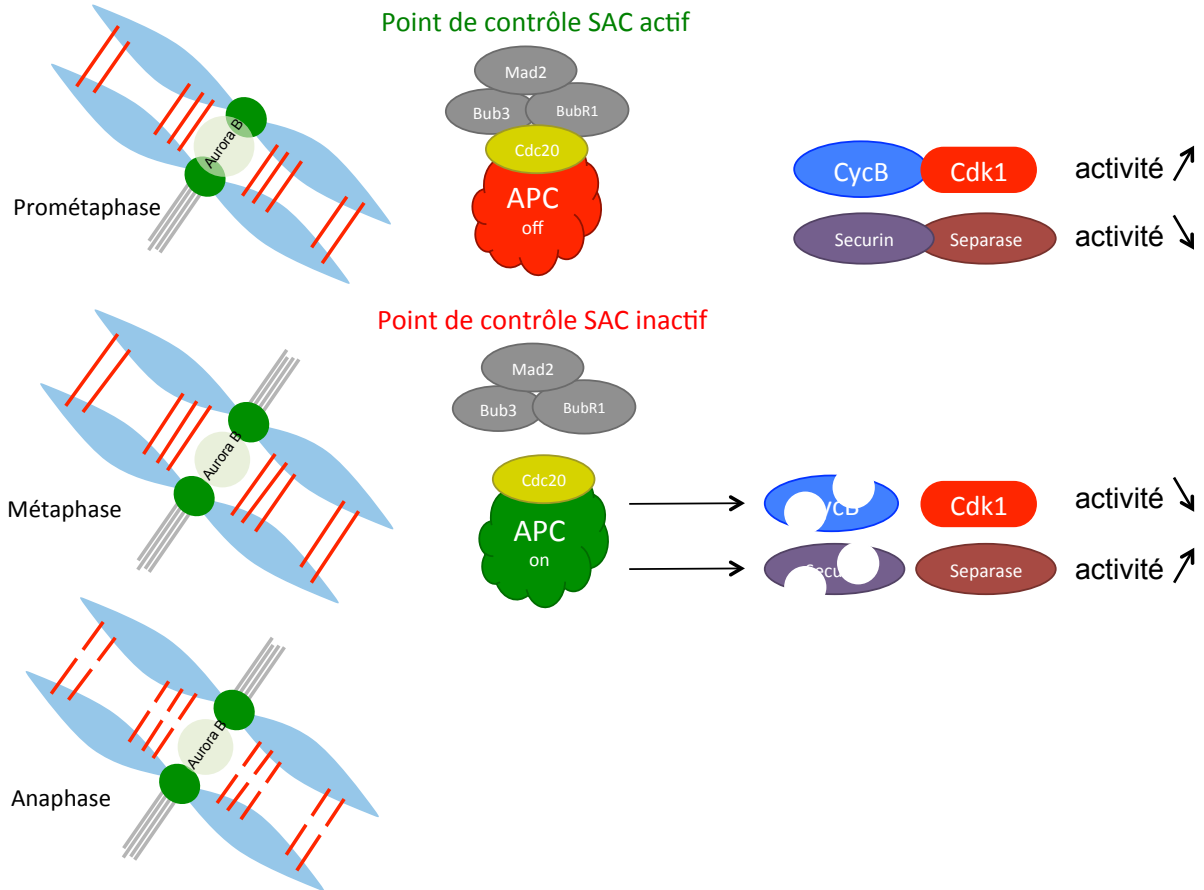


Figure 11 : **Représentation du point de contrôle à la transition métaphase/anaphase.** A la prométaphase les chromosomes sont en cours d'attachement et le point de contrôle SAC est actif le complexe CycB/Cdk1 est actif et la Sécurine inhibe la séparase. Le gradient d'Aurora B permet de détachement des mauvais attachements. Une fois les chromosomes correctement attachés à la métaphase le complexe SAC devient inactif, la Cycline B et la sécurine sont dégradées libérant la Cdk1 qui devient inactive et la séparase devient active. Les kinétochores sortent du gradient d'Aurora B. Une fois libre la séparase libèrent les chromatides sœurs et il y a séparation.

1.4 Les kinases dépendantes des cyclines

Les Cycline-dépendante des kinases (Cdks) sont des protéines extrêmement conservées chez les eucaryotes, ce sont des sérine/threonine kinase (elles vont phosphoryler les résidus amino-acides des sérines et thréonines) découvertes chez l'organisme *S. pombe* et a valu un prix nobel (Beach et al., 1982). Elles sont des composantes majeures de la régulation du cycle cellulaire. Elles sont synthétisées de manières constitutives et peuvent se lier à une ou plusieurs cyclines au cours du cycle (fig.12.a) (Morgan, 1997). En effet leur action de phosphorylation est active lorsqu'elles sont en complexe avec les cyclines car leur liaison va modifier le site actif de la protéine permettant son activité (Brown et al., 2015). De plus les Cdks peuvent aussi être régulées, notamment inhibées par des CKIs qui sont des protéines inhibitrices spécifiques comme p21 (Charrier-Savourin et al., 2004).

La protéine Cdk1 qui est essentielle dans cette étude en effet elle est impliquée au démarrage du cycle en G1 et active la protéine MPF (Chesnel et al., 2007) elle agit ensuite en phase réplication de l'ADN en contrôlant son initiation et la duplication des centrosomes (Hochegger et al., 2007) puis à la transition métaphase/anaphase (décrit plus haut) où elle devient inactive jusqu'à la reprise du cycle en G1. Elle correspond à Cdc28 et Cdc2 chez *S. cerevisiae* et *S. pombe* respectivement et Cdc2 chez l'Humain (Liu and Kipreos, 2000).

1.5 Les cyclines

Les cyclines sont une famille de plusieurs protéines qui participent à la régulation du cycle cellulaire. Leurs découvertes ont été faite chez l'embryon d'oursin *Arbacia punctulata* et a value un prix nobel (Evans et al., 1983). La famille des cyclines est divisée en 3 groupes, le premier joue un rôle dans le cycle cellulaire, dans le deuxième groupe les actions sont dépendantes de chaque groupes vivants (plante, champignons et animaux) et le troisième dans la régulation de la transcription (fig.12) (Ma et al., 2013).

Kingdom	Species	Group I											Group II			Group III						Total		
		A	B	D	E	F	G	I	J	O	SDS	CLB	CLN	P	Y	PCL	C	H	L	K	T		SSN	CCL1
Animals	<i>Homo sapiens</i>	2	3	3	2	1	2	2	2	1	-	-	-	-	3	-	1	1	2	1	2	-	-	28
	<i>Gallus gallus</i>	2	1	3	2	1	2	2	2	-	-	-	-	2	-	1	1	1	1	1	-	-	-	22
	<i>Danio rerio</i>	1	4	5	2	1	2	2	2	-	-	-	-	2	-	1	1	2	1	3	-	-	-	29
	<i>Ciona intestinalis</i>	3	1	1	2	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1	2	1	-	-	-	14
	<i>Drosophila melanogaster</i>	1	2	1	1	-	1	-	1	-	-	-	-	1	-	1	1	1	1	1	-	-	-	13
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	1	4	1	1	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	1	1	-	-	-	-	-	11
Fungi	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	3	-	3	-	1	-	-	1	1	1	15
Plants	<i>Arabidopsis thaliana</i>	10	9	10	-	-	-	-	-	1	-	-	8	-	-	2	1	1	-	5	-	-	47	
	<i>Oryza sativa</i>	6	7	13	-	6	-	-	-	1	-	-	3	-	-	1	1	1	-	3	-	-	42	
	<i>Physcomitrella patens</i>	8	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	1	2	1	-	3	-	-	22	
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	-	2	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	8	
Protists	<i>Bigeloviella natans</i>	-	9	2	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	2	-	2	3	-	-	-	-	23	
	<i>Dictyostelium purpureum</i>	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	1	3	1	1	-	-	-	-	14	
	<i>Leishmania major</i>	-	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	

Figure 12 : Distribution des cyclines chez les organismes eucaryotes. (Ma et al., 2013).

Chez tous les organismes elles ont en communs une des résidus extrêmement conservés au niveau de la région « boîte de cycline » qui permet le lien avec les protéines kinases cycline-dépendantes (Cdks), elle correspond à environ 100 acides aminés et est située en centre de la séquence protéique (Lees and Harlow, 1993). Les cyclines mitotiques possèdent également en leur partie N-terminale une séquence de destruction qui permettra au cours de la mitose d'induire une polyubiquitination et sa destruction par le protéasome. Elles sont dégradées de façon successives (fig 13.a) (Glotzer et al., 1991).

Les cyclines vont agir en complexe avec les Cdks et vont phosphoryler un grand nombre de substrats et contrôler la progression du cycle, elles ont un niveau d'expression cyclique. Chez l'Homme un grand nombre de cyclines et d'isoformes de cyclines sont présents (28), chez la Drosophile et les levures (*S. cerevisiae* et *S. pombe*) le nombre est plus réduit, respectivement 13 et 15 (Ma et al., 2013). Pour un souci de clarté seulement les cyclines chez la Drosophile sont représentées en figure 13.b. Les cyclines A, B et B3 font parties de la phase mitotique chez la Drosophile. La cycline D agit en complexe avec la kinase Cdk4 et pourrait stimuler la croissance cellulaire et agir pour la progression G1/S (Datar et al., 2000). La cycline E et elle requise pour la progression en phase S (fig 13.b) (Meserve and Duronio, 2015).

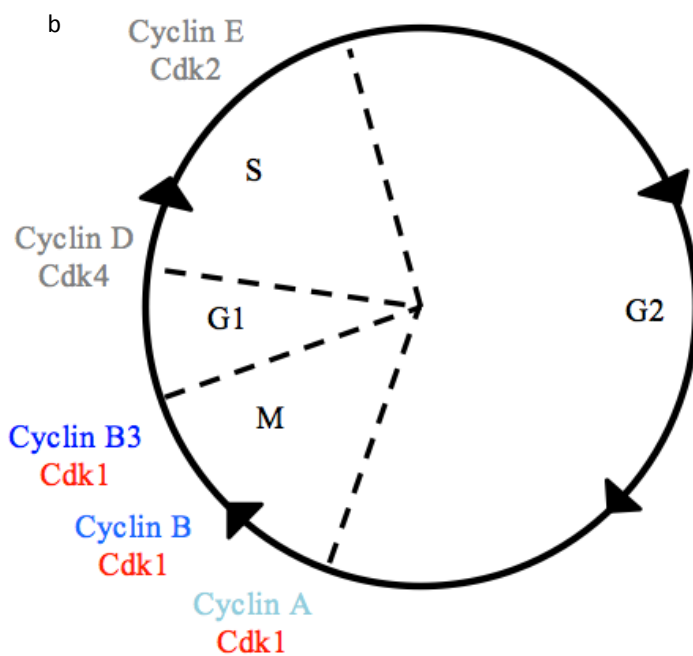
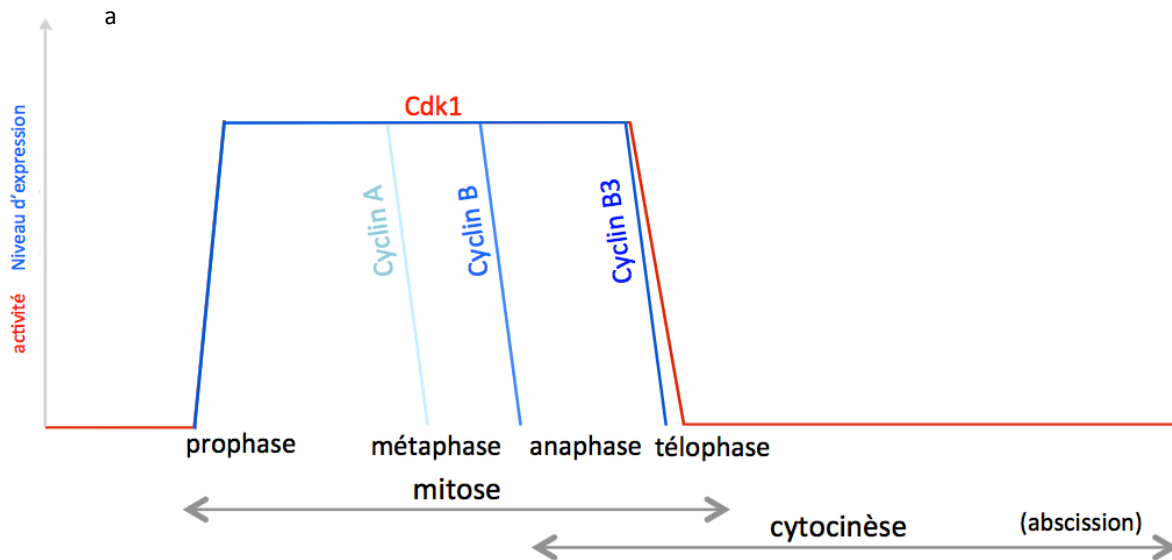


Figure 13 : Régulation du cycle cellulaire chez la Drosophile et niveau des cyclines à l'étape de mitose, cytocinèse et abscission. a, Les 5 cyclines régulent le cycle et permettent sa poursuite. b, L'expression des Cyclines A, B et B3 permettent une activités de Cdk1 et sont successivement dégradées à la métaphase, la transition métaphase/anaphase et la fin d'anaphase.

1.5.1 Les cyclines mitotiques

Chez l'organisme *Drosophila melanogaster* il existe 3 cyclines mitotiques. A, B et B3 qui part leurs actions et leurs dégradations vont permettre la poursuite de la mitose jusqu'à la sortie (Lehner and O'Farrell, 1990; Yuan and O'Farrell, 2015):

- La cycline A

C'est une cycline très conservée au cours de l'évolution. Chez les vertébrés cette cycline va être impliquée en phase S et à la transition G2/M. Chez l'organisme Drosophile elle possède 2 isoformes (CycA-RC/RA) (Flybase.org), elle est la première cycline à démarrer la mitose en complexe avec Cdk1 et elle va être dégradée avant la transition métaphase/anaphase et permettre la ségrégation des chromosomes, en revanche elle n'a pas de rôle en phase S et à la transition G2/M son rôle est mal défini (Afonso et al., 2015).

Des études menées sur cette cycline chez l'embryon de Drosophile ont mis en évidence qu'en présence de CycA stable (dépourvue de sa destruction box en N-term) les cellules s'arrêtent en métaphase et les chromosomes restent bloquées au plan équatorial (fig. 14.a) (Parry and O'Farrell, 2001).

- La cycline B

Cette cycline va être dégradée après la Cycline A à la transition métaphase/anaphase. Chez l'Homme elle correspond à la cycline B1 avec Cdk1 elle constitue le complexe MPF qui initie la mitose. Une fois le complexe actif il va participer par la phosphorylation de nombreux substrats à la condensation des chromosomes, à la rupture de l'enveloppe nucléaire et l'assemblage du fuseau. Elle joue donc un rôle primordial dans la régulation de la mitose (Hershko, 1999). En effet des études menées chez l'embryon de Drosophile sur la cycline stable (dépourvue de sa partie N-term, destruction box) va provoquer une anaphase incomplète, un retour en prométaphase sans cytokinèse (fig 14.a, b), on voit une mauvaise ségrégation des chromosomes (Parry and O'Farrell, 2001). En revanche dans des embryons mutants pour la Cycline B, on observe une ségrégation plus rapide et une cytokinèse précoce: on peut voir sur la figure 13 le degré de séparation des chromosomes et en vert les cellules

ayant déjà l'apparition de la cytokinèse et en orange celle qui ne l'ont pas encore démarré (fig 14.c) (Echard and O'Farrell, 2003).

- La cycline B3

Elle va être dégradée durant l'anaphase. Chez la Drosophile elle possède 2 isoformes (CycB3-RB/RA) Flybase.org. Et sa stabilisation, où la protéine va être tronquée de sa partie N-term, chez l'embryon va provoquer une anaphase complète mais les chromosomes restent condensés aux pôles et la cytokinèse se fait (fig14.a) (Echard and O'Farrell, 2003; Parry and O'Farrell, 2001). En condition de mutant pour la Cycline B3 le phénotype est similaire mais plus prononcé à celui du mutant de la Cycline B, avec une ségrégation plus rapide et une cytokinèse précoce (fig 14.c) (Echard and O'Farrell, 2003).

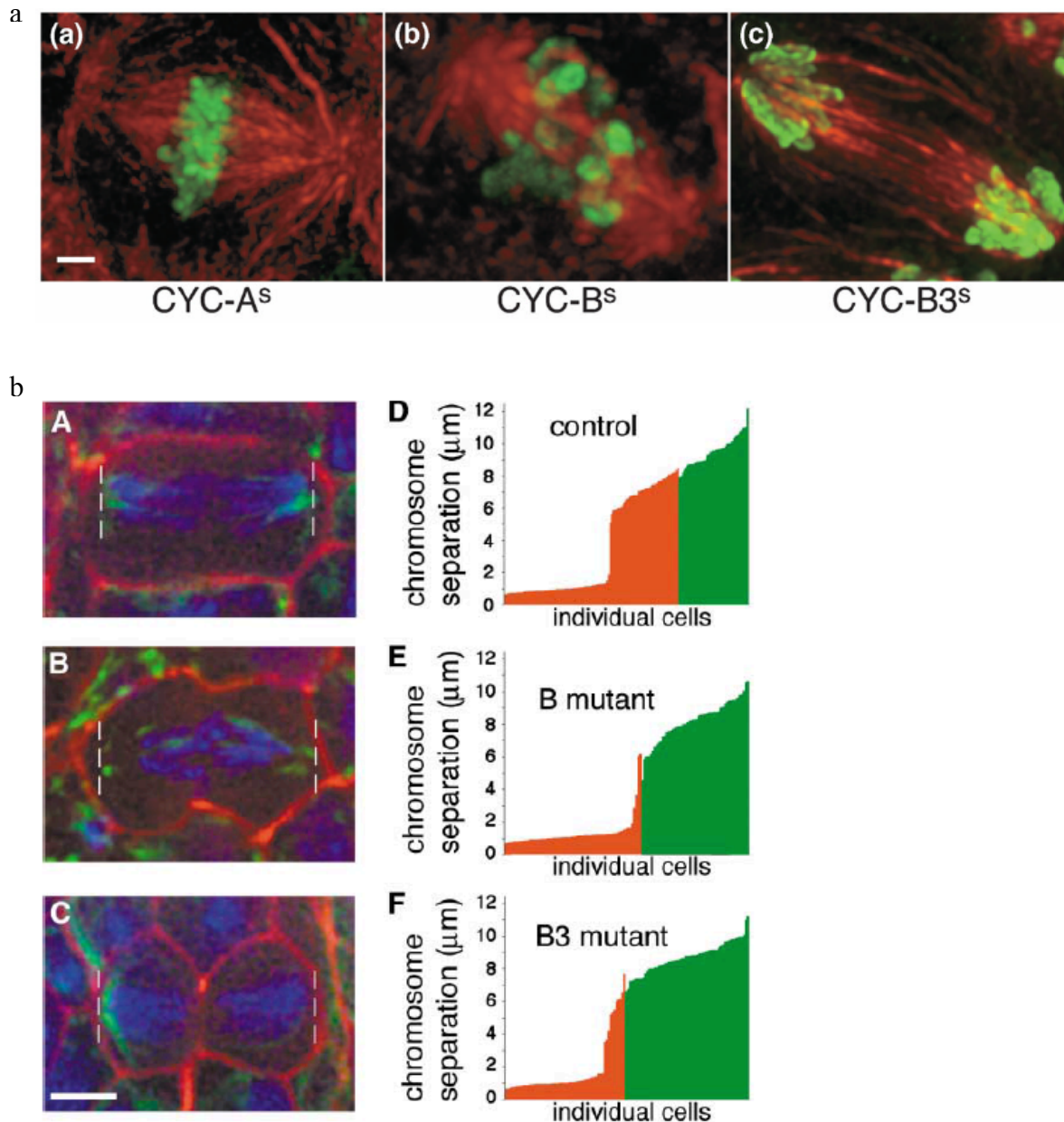


Figure 14 : **Phénotypes des embryons en présence de Cyclines stables ou mutants pour les cyclines.** a, Expression des Cyclines stables chez l'embryon fixés. La CycA stable arrête les chromosomes en métaphase, la CycB-GFP stable empêche la cytokinèse et la CycB3 stable empêche la décondensation (Parry and O'Farrell, 2001). ADN en vert, β -tubuline en rouge. b, Embryons mutants pour les Cyclines B et B3 suivi des plots du degré de séparation des chromosomes. Cellules avec une cytokinèse démarrée en vert ou non démarrée en orange. F-Actin/Phalloïdin en rouge, α -tubulin en vert et l'ADN en bleu (Echard and O'Farrell, 2003).

1.6 Organisme modèle

L'étude du cycle cellulaire est essentielle à la compréhension du vivant. Chez tous les organismes eucaryotes ce cycle est très conservé (Harashima et al., 2013), son étude peut donc être réalisée sur différents organismes. Les organismes simples sont les plus utilisés ; Les levures à bourgeons et fission (*Schizosaccharomyces pombe* et *Saccharomyces cerevisiae*), la mouche à fruit (*Drosophila melanogaster*) et le nématode (*Caenorhabditis elegans*).

- *Schizosaccharomyces pombe* et *Saccharomyces cerevisiae*. Ceux sont des organismes unicellulaire que l'ont peut facilement synchroniser et muter par double recombinaison homologue notamment. Elles possèdent de petits génomes (3 et 16 chromosomes). De plus, elles ont une croissance très rapide. L'étude chez *S. pombe* a permis l'obtention d'un prix nobel en 2001 pour des découvertes clés dans le contrôle du cycle cellulaire et la mise en évidence de leur caractère universel (Moser and Russell, 2000) chez *S. cerevisiae* (Hartwell, 1974). Ces deux organismes levures malgré leur famille commune sont séparés par 300 millions d'années d'évolution. L'étude de *Saccharomyces cerevisiae* permet l'étude de division asymétrique (Sipiczki, 2000).
- *Drosophila melanogaster*. C'est l'un des organismes les plus étudié et constitue l'organisme modèle de cette étude. Elle est petite, facile à élever, elle possède un cycle de reproduction important (500 œufs en 10 jours). Elles n'ont que 4 paires de chromosomes ; 3 autosomiques et 1 sexuel et leur génome est entièrement séquencé. En plus de l'étude d'embryons, les cellules S2 (Schneider 2 cells) dérivées de culture primaire d'embryons (20-24 heures) de lignée macrophage sont utilisées. Elles sont facilement cultivables, elles peuvent intégrer des protéines recombinantes fluorescentes et la réduction d'expression par les ARNdb est très efficace (Beckingham et al., 2005).
- *Caenorhabditis elegans*. Les gonades de cet organisme servent de modèle pour la formation de syncytium (plusieurs noyaux dans le même cytoplasme). L'utilisation de ARNdb est également très efficace (Ohkumo et al., 2008). Son génome est entièrement séquencé, il est facile à manipuler et à observer. Il possède 6 chromosomes dont 1 sexuel qui peut être hermaphrodite.

2 Projet de recherche

Hypothèse

La mitose est un processus très régulé notamment par les complexes Cdks/Cyds., chez la Drosophile il existe 3 cyclines mitotiques A/B/B3. Ces cyclines ont une fonction partiellement redondante et vont être successivement dégradées. La Cycline B est connue pour avoir un rôle en complexe avec Cdk1 dans le processus de ségrégation des chromosomes bien qu'elle ne soit pas essentielle. En revanche peu d'études sont menées à travers la cytokinèse, mais certaines sur l'embryons indiquent un rôle potentiel de cette cycline dans ce processus (Echard and O'Farrell, 2003). De plus, des études récentes montrent une implication potentielle de cette cycline à la fin de la cytokinèse, en abscission (Mathieu et al., 2013).

L'hypothèse de travail confère un rôle de la Cycline B. Par sa dégradation la cycline va coordonner la propre activation et régulation de la voie de cytokinèse.

Expérimentation

L'étude a été menée par microscopie à fluorescence à haute résolution en temps réel. La localisation et la dynamique de protéines recombinantes couplées à des fluorophores ont été suivies à travers principalement la cycline B ainsi que son mutant non dégradable couplés en GFP, d'autres protéines spécifiques de la cytokinèse ont également été utilisées. Ces protéines sont suivies dans des cellules S2 de Drosophile, modèle d'étude particulièrement efficace dans la transfection et l'inhibition via l'utilisation d'ARNdb utilisé ici (Kao and Megraw, 2004). Ces approches expérimentales ont permis d'orienter l'étude en trois approches ; en gain de fonction par la protéine non dégradable, perte de fonction par l'utilisation d'ARNdb contre l'endogène et par la localisation.

Objectifs

- Caractériser l'action de la Cycline B non dégradable sur le processus de la cytokinèse.

L'hypothèse prévoit une inhibition de certaines actions protéiques du réseau de cytokinèse qui vont être visible.

- Tester la perte de fonction de la Cycline B et Cdk1 sur le processus de cytokinèse

L'hypothèse prévoit une accélération de l'activation de ce processus ou un changement de son organisation

- Déterminer la localisation de la Cycline B lors de la cytokinèse.

L'hypothèse prévoit une détection au midbody tardif.

3 Matériel et Méthodes

3.1 Les constructions

Les séquences d'ADNc codant pour les protéines ont été réalisées par PCR pour les protéines Shrub, Vps4, CycB et DB200-CycB (boite de destruction seule) les amorces sont présentées en tableau 3 et annexe 6. Les constructions de Shrub et Vps4 ont été construites en vue d'utilisations ultérieures. Pour les protéines CycB^{stable}-GFP et Cdk1 les séquences ont été reçu des laboratoires de Dr. V. Archambault (IRIC/UdeM) et Dr. S. Campbell (UAlberta), respectivement. Les séquences utilisées étaient dépourvues de codons stop et introduites dans les plasmides pENTR-D-TOPO (Invitrogen). Les séquences pour les protéines Cycline B, Shrub, Vps4 et Cdk1 correspondaient aux ORFs, la séquence de la protéine Cycline B stable était tronquée de sa partie N-terminale (les 90 premiers acides aminés). Une fois dans pENTR les plasmides étaient envoyés à séquencer pour vérification des séquences nucléiques. Quand les séquences étaient correctes les protéines fusions étaient passées sur plasmides pMT ou pAC par recombinaison puis transformation. Les constructions utilisées sont en figure 15.b.

La recombinaison était faite par le principe de clonage « Gateway ». En effet cette technique permet le transfert de fragments d'ADN du plasmide « donneur » dont la séquence d'intérêt est flanquée des sites « attP » dans des plasmides d'intérêts « receveurs » flanqués de la séquence « attB » tout en gardant la bonne ORF. Par recombinaison, sur le plasmide d'intérêt ces séquences donneront les sites attL et attR. Pour cela on a utilisé 0,4 µl de buffer clonage, 0,25 µl de vecteur d'entrée, 0,25 µl de vecteur de destination, 0,7 µl d'H₂O et 0,4 µl d'enzyme de clonage dans un tube eppendorf pendant 1h à température ambiante (Hartley et al., 2000).

Suite à ça une expérience de transformation a été réalisée. Elle consiste à amplifier le plasmide d'intérêt. On a utilisé 50µl de bactéries pour 2µl de produit de recombinaison. Le MIX a été mit 15 minutes sur glace, 30 secondes à 42°C pour réaliser un choc thermique puis 2 minutes sur glace. Ensuite 250µl de milieu LB a été ajouté et mit 1h à 37°C et étalé sur boite de gélose avec antibiotique Ampicilline pour la sélection des bactéries ayant intégrées le

plasmide.

Tableau 1 : Séquences des amorces d'hybridations pour la construction de protéines recombinantes

CycB-RB F	CACCATGGCCGCCCTTGAAAAGA
CycB-RB R	TTTCCTCTGGCTCTGGCCCA

3.2 Les lignées cellulaires

Toutes les cellules utilisées étaient des S2 « Schneider 2 cells » qui dérivent de culture primaire d'embryons de *Drosophila melanogaster* de stade tardif d'une lignée de type hémocyte/macrophage (Yang and Reth, 2012). Elles étaient produites par transfection à partir de plasmide pMT ou pAc, promoteur *metallothionein* inductible par le cuivre ou le promoteur constitutive du gène *actine 05C* (tableau 1).

Tableau 2 : Plasmides utilisés pour les créations de souches

pMT CycB ^{stable} -GFP
pMT CycB-GFP
pAc H2B-wch
pAc tubuline-mCh
pAc Anilline-mch
pMT myosin-mCh
pCoHygro
pMT Anillin-GFP
pMT Tubulin-mCh

Les plasmides utilisés (tableau 2) contenaient des protéines spécifiques tagguées en fluorescence (tableaux 1). Pour la transfection les cellules ont été mises en culture dans des plaques de 24 puits (Falcon) la veille. Lorsque une confluence suffisante était atteinte (90% de la surface du puit recouverte) un mélange était réalisé avec les ADN plasmidiques avec du

pCoHygro (Invitrogen) dans un milieu Schneider 1X (Gibco) sans sérum, parallèlement un autre mélange était réalisé avec de la Cellfectin II Reagent (Invitrogen) dans du milieu sans sérum également, les deux étaient incubés pendant 15 à 20 minutes à température ambiante. Le milieu avec Cellfectin était ensuite réparti dans le premier mélange dans un rapport 1/8 suivit par une incubation de 15 à 20 minutes. Le milieu complet était enlevé des cellules S2 et remplacé par un milieu sans sérum, après 30 minutes le milieu était changé par le mélange ADN/Cellfectine, elles étaient ensuite incubées de 3 à 4h. Après ce temps le milieu était remplacé par un milieu complet pour 48h et de nouveau changé par un milieu complet avec hygromicine B (Invitrogen, 50mg/mL) pendant 4 semaine le temps de la sélection. A la fin de ce protocole le milieu était renouvelé toutes les semaines.

Tableau 3 : Souches S2 construites utilisées au cours de cette étude

MD1	pMT cycB ^{stable} -GFP, pAC H2B-mcherry
MD3	pMT cycB ^{stable} -GFP, pAC Anilin-mcherry
MD9	pMT cycB ^{stable} -GFP, pAC tubulin-mcherry
MD11	pMT cycB-GFP, pAC H2B-mCherry
MD12	pMT cycB-GFP, pAC Anilin-mcherry
MD22	pMT cycB-GFP, pAC tubulin-mcherry

3.3 Génération d'ARN à double brins (ARNdb) interférents

Les ARNdb était générés à partir d'ADNc (de préférence) ou génomique avec des amorces (tableau 4) contenant une séquence initiale riche en GC (5'-GGGCGGGT-3') pour la premières PCR. En effet cette expérience nécessite deux étapes de PCR puis une étape de

transcription in vitro. La première PCR permet d'inclure une séquence spécifique 5'-GGGCGGGT-3'.

Tableau 4 : Primers utilisés pour la construction d'ARNdb

CycB forward ARNdb 3'UTR	gggcgggtCAGAGGAAATAGTGCGGTCCA
CycB reverse ARNdb 3' UTR	gggcgggtATGAAATGATTTACGGGTAC
CycA forward ARNdb 5' UTR	gggcgggtCTAACATTTACGACGTGTTGA
CycA reverse ARNdb 5' UTR	gggcgggtGAAACTGGCCATGGTGCGCTC
CycB3 forward ARNdb 3' UTR	gggcgggtAAGCAATCTGTCGTAGGACAG
CycB3 reverse ARNdb 3' UTR	gggcgggtAGTTAGGTTTATTTAATGCTG

Les produits PCR obtenus ont été utilisés pour une deuxième amplification avec une amorce universelle contenant la séquence du promoteur de la polymérase d'ARN T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACGGGCGGGT-3'). Ce deuxième produit PCR a servi de matrice pour la réaction de transcription in vitro à partir du kit Promega Ribomax T7. Cette réaction de 20µl se fait à 37°C toute la nuit, l'ADN restant a ensuite été digéré par 0,5µl d'ADNase pendant 15 minutes à 37°C et les ARN nouvellement synthétisés étaient précipités avec 8µl d'Na Acetate, puis lavés dans 225µl d'éthanol, séchés à l'air et resuspendu dans 100µl d'eau. Les brins d'ARN complémentaires étaient ensuite incubés dans un bain d'eau chauffé à 90°C pour qu'ils s'hybrident lors de son refroidissement à température ambiante. Au final les produits ont été vérifiés et quantifiés sur gel d'agarose 1% avec 0,5µg/ml de Bromide d'Ethidium. L'action de l'ARNdb conte la Cycline B endogène est représenté en figure 15.a.

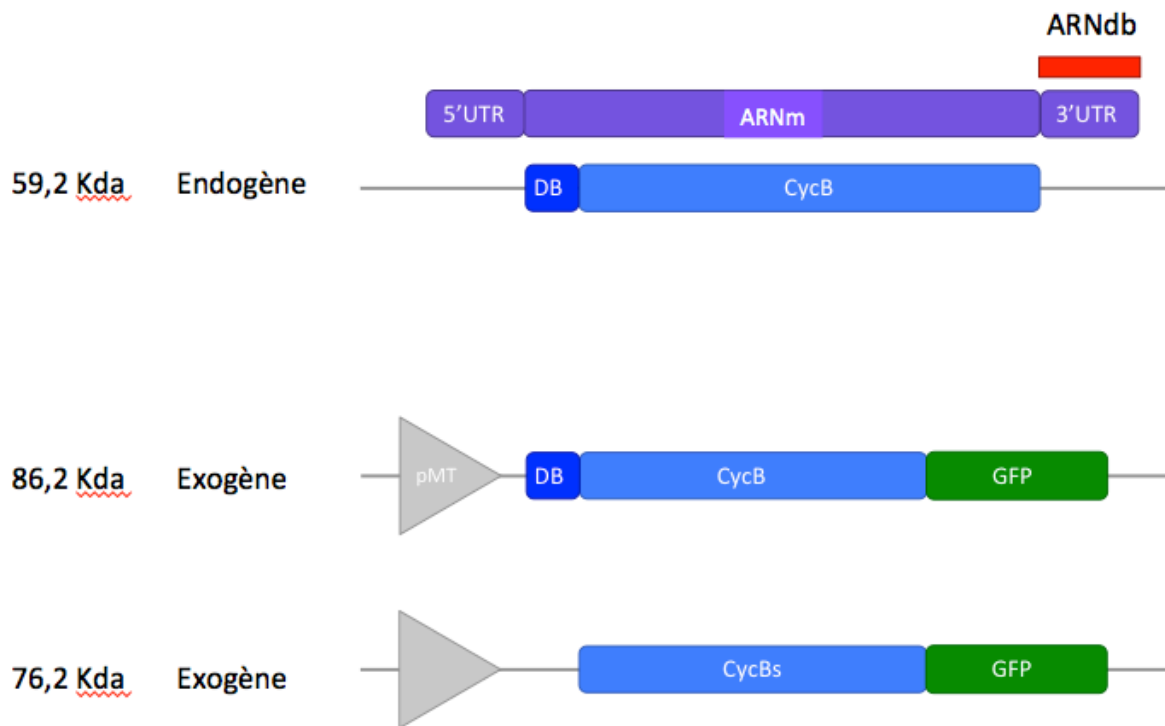


Figure 15 : **Constructions de la Cycline B utilisées au cours de l'étude.** L'utilisation d'ARNdb contre l'ARNm de la cycline B endogène pour l'étude en perte de fonction et les deux constructions de CycB-GFP et CycB^{stable}-GFP couplées en GFP pour l'étude en gain de fonction.

3.4 Microscopie

La plupart des résultats ont été obtenus par microscopie en temps réel sur microscope inversé Leica DMI6000B avec un système Ultaview Vox spinning disc confocal (PerkinElmer) et une caméra Orca-R2 CCD (Hamamatsu).

Les acquisitions ont été réalisées sur cellules S2 cultivées d'abord en plaque 96 puits en plastique puis transférées soit en plaques 96 puits à fond de verre ou en plaque 8 puits également à fond de verre, l'acquisition a été réalisée avec un objectif Plan Apo 40x (NA 0,85) en binning 2x2 et Plan Apo 63x (NA 1,4) à immersion pour les images à haute

résolution en binning 2x2 ou 1x1. Pour l'analyse des acquisitions le logiciel Volocity (version 6.0) a été utilisé. La quantification des phénotypes est faite manuellement par le suivi des cellules une par une. Les différentes mesures de temps sont mesurées manuellement également grâce aux temps d'acquisitions préalablement choisis sur Volocity. Pour tester la significativité des résultats des tests de students ont été menés. Les distances mesurées sont réalisées sur ce même logiciel, la distance entre deux points est tracée manuellement, la mesure en μm , en revanche, est automatique.

Pour induire l'expression des protéines recombinantes des plasmides pMT, placées sous promoteur metallothioneine, les cellules ont été mises en culture la veille ou un jour avant et du CuSO_4 a été ajouté 12h ou 24h avant à une concentration de $250\mu\text{M}$.

Pour induire l'inhibition de protéines endogènes $1\mu\text{g}$ d'ARNdb a été ajouté 3 jours avant l'acquisition pour les cyclines avec en parallèle des conditions comportant un ARNdb contrôle LacI (protéine d'*Escherichia coli*).

Pour induire l'inhibition de la protéine Cdk1 la drogue R3306 a été utilisée à un ratio de 1/200 à $5\mu\text{M}$ avec comme contrôle DMSO (diméthyl sulfoxyde) au même ratio.

3.5 Immuno-buvardage de type Western

Pour réaliser ce western les cellules S2 sauvages et les cellules de lignées spécifiques ont été mises en culture dans des plaques de 96 puits, 8 puits par conditions plus 2 puits pour l'acquisition au microscope (tableau 5).

Les cellules ont ensuite été récupérées et lysées par un tampon spécifique (75mM de HEPES, 150mM de KCl, 2mM de MgCl_2 , 5% de glycérol, 0,20% de triton X-100, 1mM de DTT et enfin 10ml de ddH₂O) plus 1 tablette d'inhibiteur de protéase (Roche). Ensuite les protéines ont été dosées par le protocole de Bradford (Biorad), suivant les résultats les concentrations ont été ajustées avec le tampon de lyse. Les échantillons ont été préparés en ajoutant un

tampon Laemmli (20% de glycérol, 4% de SDS, 0,125M de Tris-HCl, 0,05% de bleu de bromophenol et 200mM de DTT) chauffés 5 minutes à 90°C.

Ici 40 µg de protéines ont été déposées sur gel SDS-PAGE à 8% et migrent à 100V avec du tampon running buffer, après elles ont été transférées sur membrane de nitrocellulose Amersham Hybond ECL (GE Healthcare) avec tampon de transfert à 0,06 A durant la nuit.

La dilution en série est réalisée à partir de 40 µg de protéines qui correspond au 100%, la concentration est diluée par deux et correspond à 20 µg de protéines 50%, puis 10 µg 25%, 5 µg 12,5%, 2,5 µg 6%, 1,75 µg 3% et 0,875 µg pour 1,5%. Les volumes sont ajustés à 50 µl par ajout de LB1X.

Après transfert la membrane a été immergée dans du rouge ponceau (0,1% Ponceau S (w/v), 5% d'acide acétique) pour vérifier la quantité de protéines, elle a été lavée dans du TBST (0,5M de Tris Base, 1,5M de NaCl, 0,2% de Tween 20) 2 fois et bloquée avec du TBST/lait 5% (Carnation, Lait écrémé en poudre) pendant 1h.

Dans un premier temps l'anticorps primaire de souris monoclonale Anti- CyclinB (330 µg/ml) (Developmental Studies Hybridoma Bank – Iowa USA) a été dilué dans du TBST/Lait 1% au ratio 1/400 et ajouté à la membrane pendant 2h ou toute la nuit. 3 lavages ont été effectués avec du TBST pendant 30 minutes. Dans un second temps l'anticorps secondaire anti-mouse peroxydase (2mg/ml) a été dilué au 1/10000 dans du TBST /Lait 1%. 5 lavages de 5 minutes dans du TBST ont été réalisés. Enfin, la membrane a été immergée avec des agents chemiluminescents (Clarity western ECL) pendant 5 minutes et elles ont été révélées sur films (Fujifilm, super RX) à différents temps d'expositions (Mahmood and Yang, 2012; Towbin et al., 1979)

Tableau 5 : Conditions réalisées pour l' immunobuvardage de type western

S2					
ARNdb LacI			ARNdb CycB		
3 jours	2 jours	1 jours	3 jours	2 jours	1 jours

CycB ^{stable} -GFP H2B-mCh					
ARNdb LacI			ARNdb CycB		
3 jours	2 jours	1 jours	3 jours	2 jours	1 jours

CycB-GFP H2B-mCh					
ARNdb LacI			ARNdb CycB		
3 jours	2 jours	1 jours	3 jours	2 jours	1 jours

Dilution en série - S2						
100%	50%	25%	12,50%	6,50%	3,10%	1,50%

3.6 La technique de FRAP

Cette technique repose sur le photo-blanchiment et le mouvement des molécules fluorescentes. Le principe est, dans une population homogène de molécules fluorescentes, de sélectionner une zone restreinte et de frapper avec un laser. Ainsi deux populations vont être créées et si aucun retour de fluorescence n'est observé cela traduit une absence de mouvement des molécules fluorescentes à l'inverse le retour de fluorescence traduit un mouvement de ces molécules. Le retour de fluorescence varie suivant les molécules marquées. En effet lors du photo-blanchissement la zone sélectionnée peut perdre jusqu'à 80-90% d'intensité, si il y a mouvement l'intensité va remonter, pouvant aller jusqu'à 90% de retour, elle va ensuite atteindre un plateau. Le taux de retour de la fluorescence correspond à la partie mobile des molécules.

Ici les acquisitions ont été réalisées d'abord une fois 30 secondes avant le FRAP, puis à 1 seconde avant, au temps 0 du FRAP enfin au maximum de la vitesse d'acquisition, ce qui correspond à 800 millisecondes d'intervalle. Le principe est illustré figure 25.a.

4 Résultats

Durant cette étude mes travaux ont porté sur l'analyse du gain et de la perte de fonction de la Cycline B et de sa localisation sur des cellules S2 chez l'organisme *Drosophila melanogaster* dans le processus de cytokinèse. L'hypothèse de départ présageait une implication de cette cycline par sa dégradation dans le processus de cytokinèse à travers le réseau protéique (figure 2). En effet elle serait impliquée en tout début de cytokinèse, à la formation et la contraction de l'anneau et agirait soit amont du réseau au niveau de la protéine Rho et donc préviendrait d'une mise en place globale de l'anneau contractil ou soit en aval sur des régulations telles que l'Anilline, l'actine ou myosine avec une mauvaise mise en place ou une mauvaise contraction de cette anneau. Elle serait également impliquée en fin de cytokinèse à l'abscission dans un tout autre réseau protéique, notre hypothèse prévoit également une action de cette cycline B en complexe avec Cdk1 dans ce processus.

Aucuns travaux au laboratoire n'avaient encore été entamés sur cette protéine en revanche d'autres études, antérieures, indiquaient une implication de cette cycline aux processus de cytokinèse de la formation de l'anneau jusqu'à l'abscission (Echard and O'Farrell, 2003; Mathieu et al., 2013). Mes résultats finaux indiquent une implication de cette protéine en début de cytokinèse et une implication de Cdk1 à l'abscission mais les modèles attendus n'ont pas pu être confirmés.

4.1 Localisation de la CycB-GFP stable au midbody précoce et CycB-GFP au midbody tardif

La CycB^{Stable}-GFP, du fait de sa non dégradation, était maintenue à la fermeture de l'anneau. Elle était retrouvée au niveau du midbody précoce durant quelques minutes (fig 16) en moyenne 20, puis évacuée. Le signal de la CycB-GFP disparaissait pendant l'anaphase

dans 100% des cellules observées (42 cellules) coïncidant avec le moment de sa dégradation au moment de la fermeture. De façon inattendue, un signal de CycB-GFP réapparaissait plusieurs heures plus tard spécifiquement au midbody tardif avant l'abscission jusqu'à la séparation. Ceci a été noté dans 56,5% des cellules. Or la CycB^{stable}-GFP, dans les cellules présentant un temps long d'abscission, ne réapparaissait pas au midbody tardif. L'étude de cette Cycline B a donc été menée en deux parties. Sa fonction et sa localisation en cytotinèse précoce et tardive (abscission).

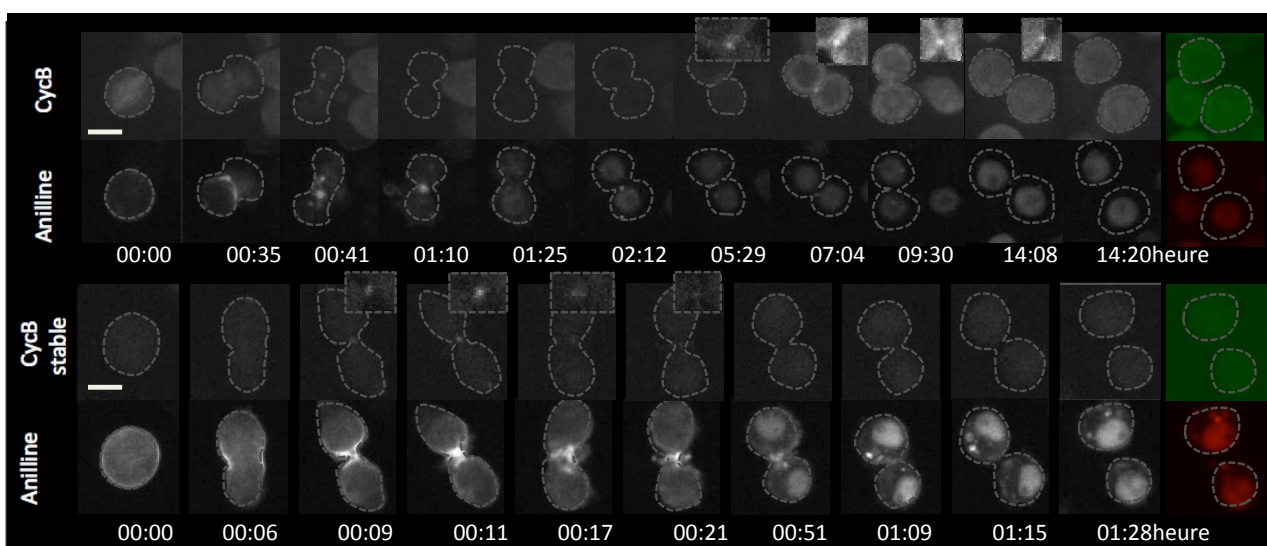


Figure 16 : **Présence de CycB-GFP au midbody tardif et CycB^{stable}-GFP au midbody précoce.** Représentation de cellules exprimant Anilline-mCh, CycB^{stable}-GFP et Anilline-mCh, CycB-GFP. Elles ont été observées après 12h d'induction avec CuSO₄. CycB-GFP est retrouvée au midbody à partir de 5h30 jusqu'à 14h. CycB^{stable}-GFP est retrouvée de 9 min à 21 min. Le niveau d'expression de la CycB^{stable}-GFP est plus réduit que la CycB-GFP, ceci s'observe également aussi au niveau du champ cellulaire. Suivi sur 24h. Objectif 40x ; échelle 5 µm.

4.2 La Cycline B et l'anneau contractile

4.2.1 La Cycline B stable augmente les temps de contraction de l'anneau et la distance de ségrégation chromosomique

La première partie de l'étude a été menée en début de cytotcinèse, d'abord en présence de cycline B stable, en gain de fonction. La souche CycB-GFP n'a pas été utilisée comme contrôle car elle n'était pas disponible au laboratoire lors de ces expériences. Les résultats attendus prévoyaient un arrêt de la mitose à l'anaphase. Une souche présentant la Cycline B stable en GFP ainsi que l'Anilline en mCherry a été utilisée, elles étaient exprimées respectivement de manière inductible et constitutive. Les résultats obtenus n'ont indiqué aucun arrêt à l'anaphase dans les cellules. Le temps de mitose globale a été mesuré du départ de l'Anillin au cortex jusqu'à la formation du midbody. Sur les deux conditions, induite – non induites, une différence significative du temps de mitose globale a été observée (p-value < 0,0002) ; de 31 min à 49 min en moyenne (fig.17).

C'est un effet qui a de nouveau été observé au cours des prochaines expériences. La Cycline B stable a donc un effet de ralentisseur sur la mitose mais elle ne l'arrête pas sur les cellules S2.

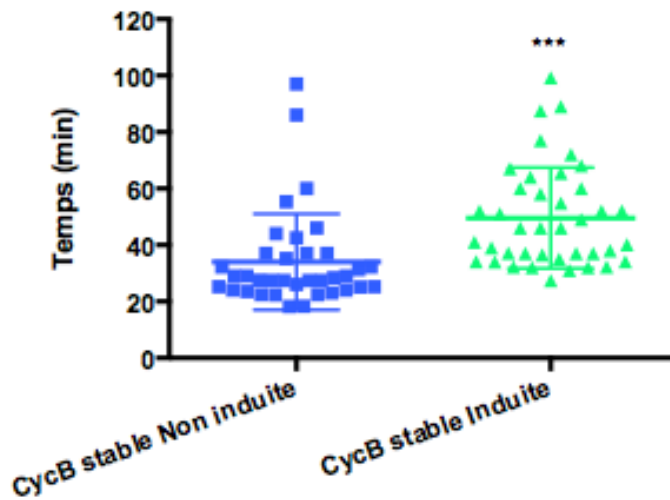


Figure 17: **Temps de mitose augmenté en présence de CycB^{stable}-GFP induite**. Chaque point représente le temps de mitose observé pour une cellule, de la mise en place de l’anillin au cortex jusqu’à la fermeture de l’anneau, dans des populations de cellules suivi sur 12h avec des images capturé tous les 2 min avec un objectif à grossissement de 40x (n > 30).

Il s’agissait ensuite de spécifier cette augmentation de temps. C’est pourquoi le processus de contraction de l’anneau a été analysé spécifiquement. Les résultats attendus prévoyaient une non contraction de l’anneau mais aucune observation n’a pu être faites dans cette direction. La durée de contraction a donc été mesurée. Le début correspondait à l’accumulation de l’Anilline aux cortex de la cellule jusqu’à la formation du midbody (figure 19 b). Une grande variabilité dans les résultats en présence de Cycline B stable induite a été observée (de 8 à 55 minutes) contrairement au contrôle (4 à 14 minutes). Il est apparu un temps de contraction plus long en présence de cette cycline stable (figure 19 a, b) allant du simple au double de manière significative ; de 10 min à 20 min (p-value < 0,0001). Il est à remarquer également que des cellules en présence de Cycline B stable induite avaient un phénotype notable, lors de la contraction elles formaient pour 1/3 des « bulles » et pouvaient avoir plusieurs anneaux contractiles en plus du principal et donner plusieurs cellules (fig. 18).

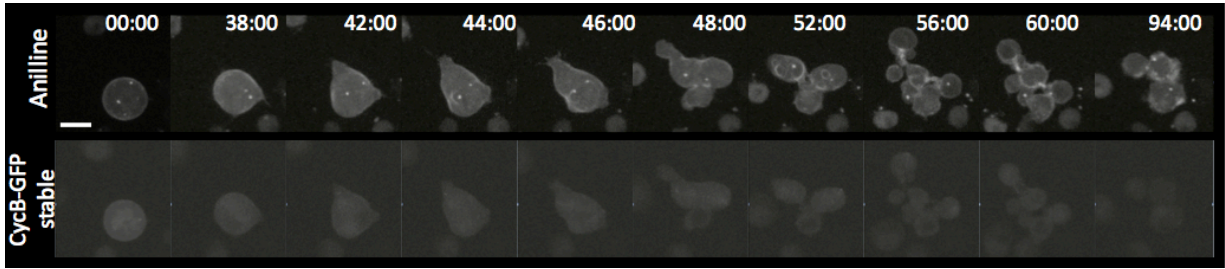


Figure 18 : Phénotype de « bulles » lors de la contraction de l’anneau en présence de CycB^{stable}-GFP. Dans la souche Anilline-mCh et CycB^{stable}-GFP jusqu’à 5 cellules sont observées avec une régression à 3 cellules à 94 minutes. Un midbody principal à été observé à 44 minutes. La cellule a été observée après 12h d’induction avec CuSO₄. Objectif 40x ; échelle 5 µm.

La Cycline B quand elle est maintenue a donc un effet visible de ralentisseur sur l’anneau de cytokinèse. Elle est donc impliquée directement ou indirectement dans le réseau protéique (fig.5).

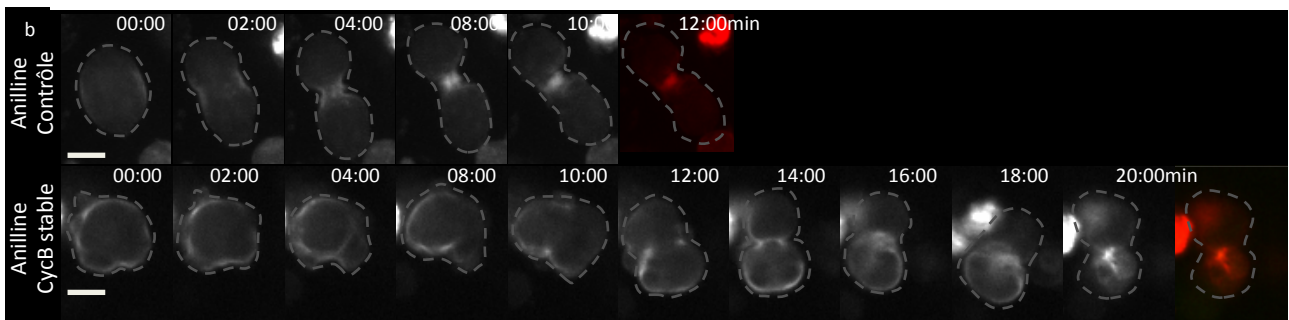
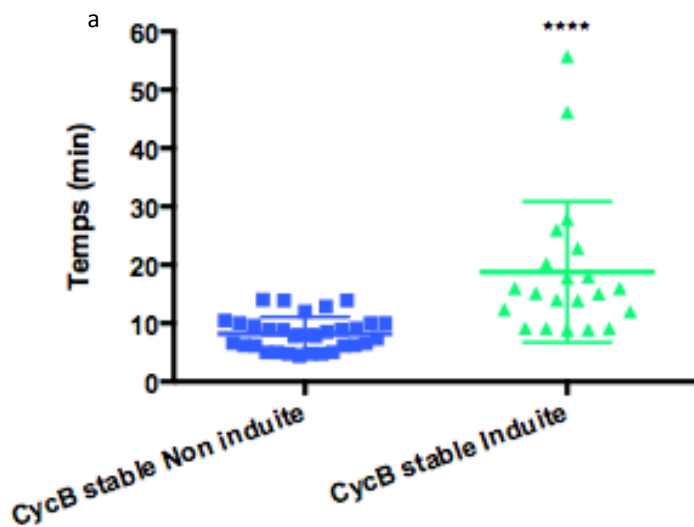


Figure 19 : **Temps de contraction de l’anneau augmenté en présence de CycB^{stable}-GFP induite.** a, Chaque point représente le temps de contraction de l’anneau jusqu’à la formation du midbody pour une cellule. b, Cellule exprimant Aniline-mCh et CycB^{stable}-GFP, seule l’Aniline est représentée pour un soucis de clarté, les cellules sont observées après 12h d’induction avec CuSO₄ ou DMSO comme contrôle (c’est à dire sans induction du plasmide de la Cycline B^{stable}-GFP). n > 20. Suivi sur 12h. Objectif 40x ; échelle 5 µm.

La formation et la contraction de cet anneau prennent place à la transition métaphase/anaphase. Il était donc essentiel de suivre en parallèle le comportement des chromosomes. Il était attendu une ségrégation ralenti et incomplète comme chez l’embryon. Les résultats obtenus ont indiqué une ségrégation complète avec une augmentation de la distance maximale de ségrégation des chromosomes en fonction du temps. Ceci n’indiquait pas un ralentissement mais une élongation de la cellule (figure 20.a). Et lorsqu’elles formaient des bulles la ségrégation était toujours complète mais l’ADN mal réparti. Sur la souche non

induite les chromosomes ont atteint une distance maximum de 15 μm en 6 minutes alors que la souche induite atteignait jusqu'à 25 μm en 15 minutes. La distance et le temps ont été augmentés. Sur le panneau ci-dessous (figure 20.b) une ségrégation maximale à 6 minutes 30 en souche contrôle contre 15 minutes en souche induite a été observée.

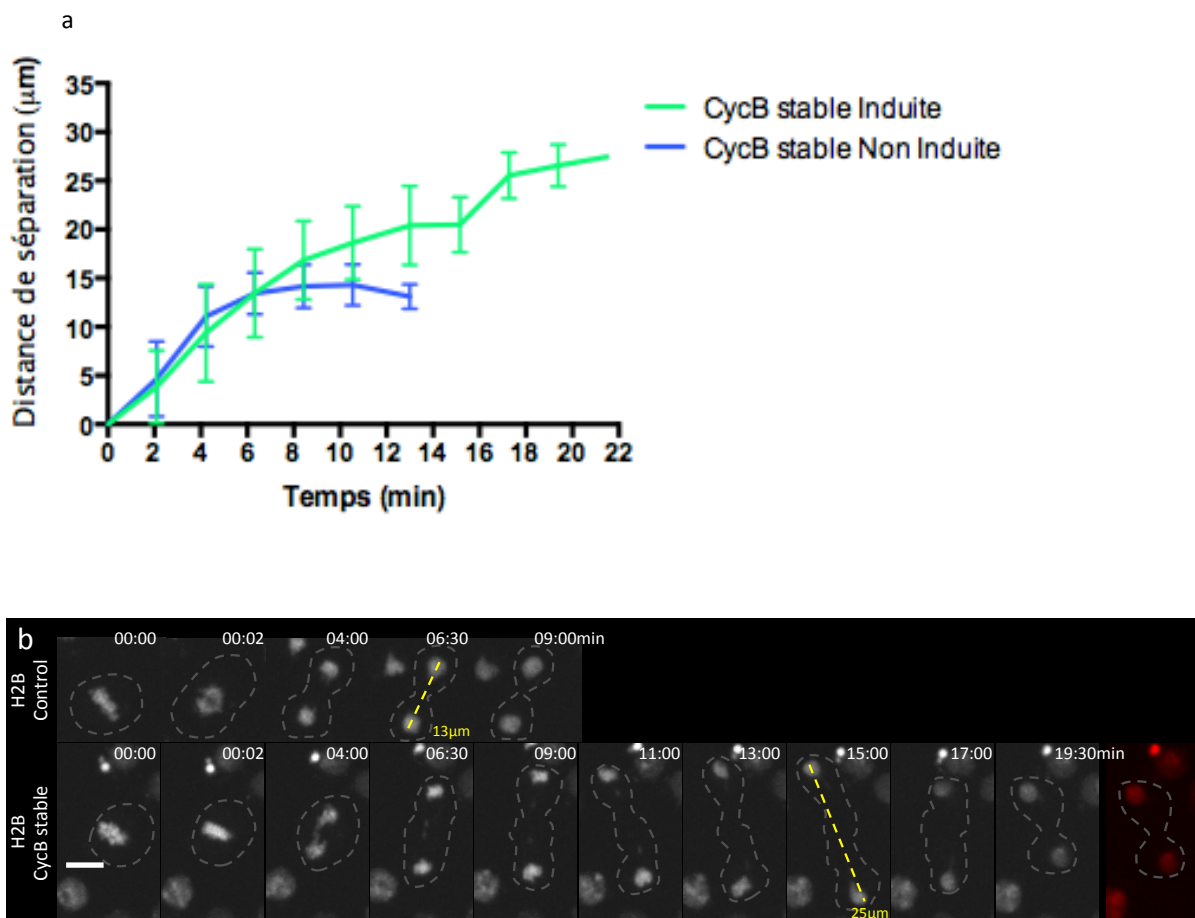


Figure 20 : La présence de CycB^{stable}-GFP induite augmentait la distance de ségrégation des chromosomes en fonction du temps. a, distance de séparation des chromosomes jusqu'à une distance maximale en fonction du temps sur cellules non induites et induites. b, Cellules exprimant H2B-mCh et CycB^{stable}-GFP, seule H2B-mCh est représenté pour un soucis de clarté, les cellules sont observées après 12h d'induction avec CuSO₄- ou DMSO comme contrôle. La distance maximum est représentée par une barre oblique jaune. n > 30. Suivi sur 12h. Objectif 40x ; échelle 6 μm .

La Cycline B stable provoque donc un ralentissement dans la contraction de l'anneau et une élongation de la distance de ségrégation chromosomique. Suite à ces expériences, l'étude a été poursuivie en perte de fonction par l'utilisation d'ARN double brin pour comprendre les effets de sa réduction d'expression.

4.2.2 Réduction du niveau d'expression de la Cycline B endogène après traitement à l'ARNdb.

L'ARNdb était dirigé contre la cycline endogène en 3' UTR (non présent sur les cyclines exogènes, figure 15). Cet ARNdb a été testé par western blot (fig.21) en utilisant 40 µg de protéines par conditions avec comme contrôle l'ARNdb LacI sur 3 jours pour déterminer les conditions optimales d'utilisation. Une première bande à 76 KDa correspondant à la cycline B stable marquée en GFP, une bande à 86 KDa correspondant à la cycline B marquée en GFP et enfin une troisième bande à 60 KDa correspondant à la cycline B endogène était observées. Dans les cellules S2 non transfectées ayant seulement la Cycline B endogène, l'expression était nettement visible en présence d'ARNdb LacI sur les 3 jours (1, 3 et 5). En présence de l'ARNdb contre la Cycline B il y avait une diminution à 2 jours de près de 90% de l'expression, pourcentage déterminé par rapport à la dilution en série qui a permis d'estimer l'efficacité de l'ARNdb en fonction de sa concentration, jusqu'à la disparition au bout de 3 jours, aucune bande n'était visible.

La CycB^{stable}-GFP présentait une intensité faible qui a augmenté néanmoins de 1 à 3 jours bien que le rouge ponceau fut très beau avec des niveaux d'expressions stables (Annexe 1) il en a été de même pour l'endogène. Malgré la présence de l'ARNdb contre la Cycline B endogène il y a toujours eu une détection de la cycline qui correspondait à une diminution de plus de 90% comparé à la dilution en série, en effet son intensité est située entre le 12,5 et 6,5% dans la dilution en série donc entre 5 et 2,5 µg. De plus le niveau d'expression de l'endogène de cette souche correspondait à l'expression de l'endogène en cellules S2 au bout de 3 jours or cet ARNdb était dirigé spécifiquement contre l'endogène, il était donc possible que la spécificité ne fut pas optimale en présence de la CycB^{stable}-GFP et qu'il y a eu une forme de compétition entre les deux types de cyclines. Cette observation a été confirmée car des expériences

similaires (Annexe 2) ont présenté un niveau plus élevé de l'expression de la CycB^{stable}-GFP mais toujours avec une détection de la Cycline B endogène en présence de l'ARNdb.

La CycB-GFP présentait une forte expression qui était constante sur les 3 jours dans les 2 conditions. En revanche les bandes de l'endogène pour cette souche étaient plus faibles, dès le deuxième jour il n'y avait plus de détection (fig.21).

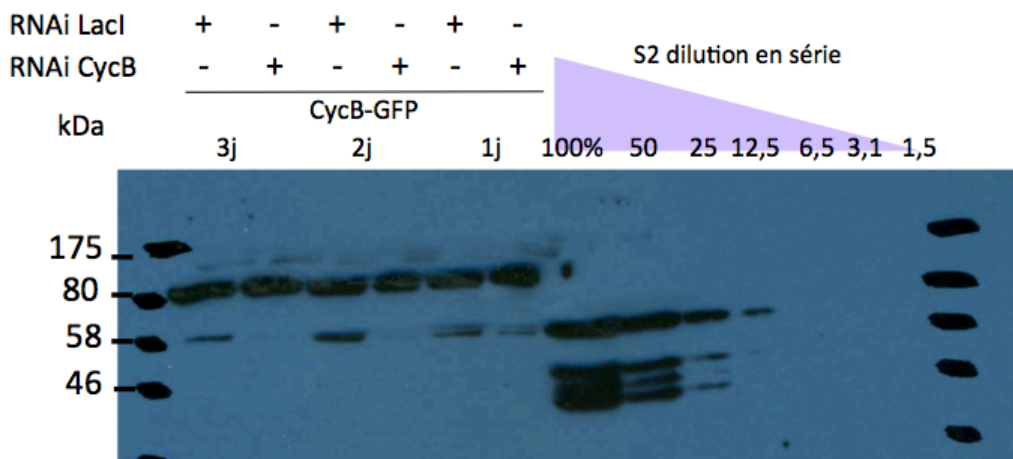
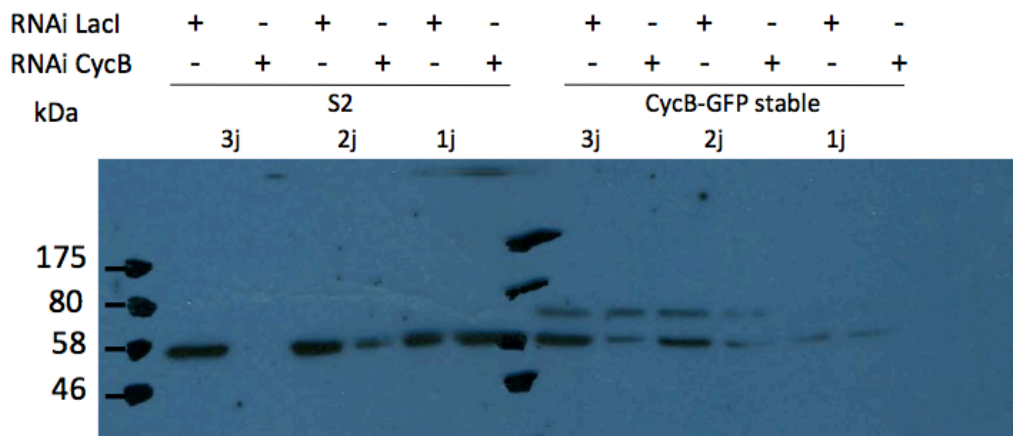


Figure 21 : **Réduction du niveau d'expression de Cycline B endogène en présence l'ARNdb.** Immunobuvardages de type western représentatifs des lysats des cellules de drosophile S2 traitées avec de l'ARNdb contre LacI en contrôle et contre CycB (3'UTR) pendant 1 jour, 2 jours et 3 jours. Expériences réalisées sur souches exprimant CycB^{stable}-GFP, Anilline-mCh ; CycB-GFP, Anilline-mCh et S2 non transfectées. La protéine a été détectée avec l'anticorps anti-CycB (dilution 1 :400). La dilution en série correspondait à 40 µg de protéines, 20 µg, 10 µg, 5 µg, 2,5 µg, 1,75 µg et 0,875 µg.

4.2.3 La réduction de l'expression de la cycline B endogène ne modifie pas le temps de contraction de l'anneau et la distance de ségrégation chromosomique

Des mesures similaires au gain de fonction ont été réalisées pour la perte de fonction sur une souche présentant la cycline endogène seule, marquée en Anilline-GFP et Tubuline-mCh exprimées de façon constitutive ou sur souche marquée en Anilline-GFP et H2B-mCh pour suivre la ségrégation chromosomique. Les résultats attendus prévoyaient une accélération de la mitose par une accélération de la contraction de l'anneau.

Pour la souche Anilline-GFP et Tubuline-mCh un temps de mitose similaire (48 et 52 min) en présence et en réduction d'expression de l'endogène (fig 22.a) été observé, sans différence significative ; p -value $< 0,3170$. La variabilité de résultats était, de plus, similaire, de 23 à 77 minutes pour ARNdb LacI et de 31 à 78 minutes pour ARNdb CycB. Dans ces conditions, aucun phénotype particulier de la mitose a été observé en absence de CycB endogène: les cellules se sont divisées normalement et l'Anilline et la Tubuline n'ont pas eu de comportement notable.

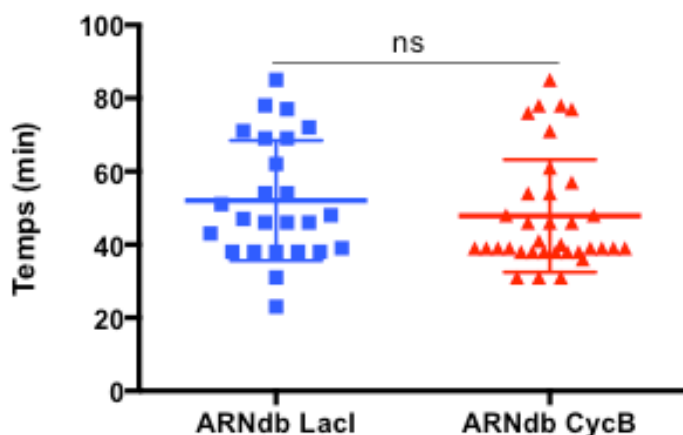


Figure 22 : **Pas de différence de temps de mitose en présence d'ARNdb contre la Cycline B endogène.** Chaque point représente le temps de mitose pour chaque cellule exprimant Anilline-GFP et Tubuline-mCh, 12h d'induction au CuSO_4^- , après 72h en présence d'ARNdb contre CycB ou LacI en contrôle. $n > 25$. Suivi sur 12h. Objectif 40x.

Sur cette même souche le temps de contraction de l'anneau a été mesuré, de la même façon grâce au suivi de l'Anilline au cortex jusqu'à la fermeture de l'anneau (fig 23.a). Ceci a révélé également, aucune différence de temps de fermeture 18 minutes pour l'ARNdb contrôle contre 17,9 minutes en moyenne pour l'ARNdb contre la Cycline B. La réduction d'expression de la CycB endogène n'a pas perturbé pas le bon déroulement de la cytokinèse de manière visible. Sur le panneau ci-dessous (fig 23.b) un phénotype similaire en présence ou absence de cycline B endogène a été observé, l'Anilline avait un comportement semblable.

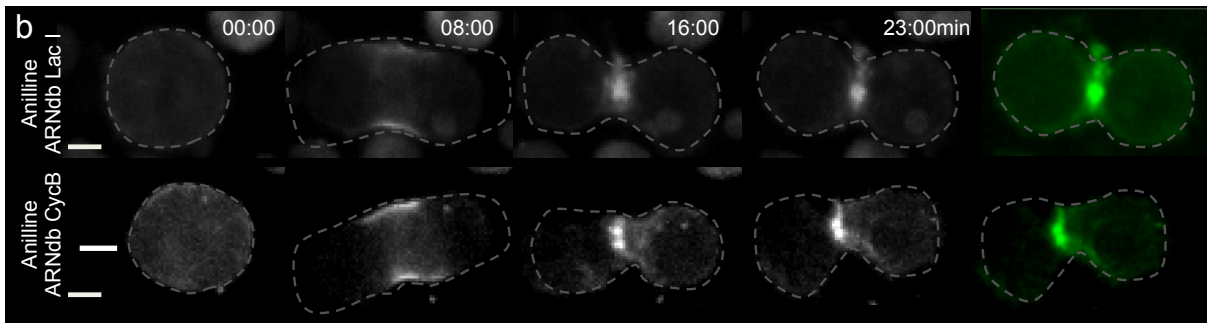
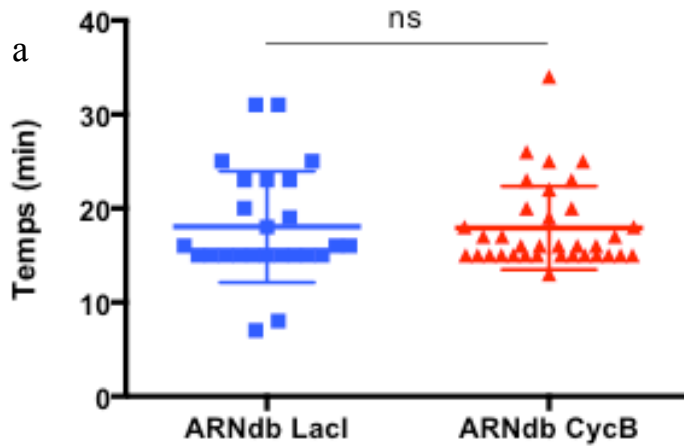


Figure 23 : La perte de fonction de la cycline B endogène ne modifie pas le temps de contraction de l'anneau. a, Chaque point représente le temps de contraction de l'anneau jusqu'à la formation du midbody pour une cellule. b, Cellule représentative exprimant Anillin-GFP et Tubuline-mCh, seule l'Anilline est représentée pour clarté, les cellules sont observées après 12h d'induction avec CuSO_4^- et 72h en présence d'ARNdb CycB ou LacI comme contrôle. $n > 30$. Suivi sur 12h. Objectif 40x ; échelle 2 μm .

Bien qu'il n'y ai pas de différence sur le comportement de l'anneau, la ségrégation des chromosomes a tout de même été observée car l'hypothèse présageait une accélération de la ségrégation. Les mesures de distance maximale en fonction du temps ont été réalisées sur une souche H2B-mCh et Anilline-GFP, les chromosomes ont été suivi de la métaphase à la télophase (fig 24.a et b). Egaleme nt aucune différence de ségrégation des chromosomes en réduction d'expression de la Cycline B endogène n'a été observée. Il n'y a pas eu d'allongement cellulaire. Sur les cellules présentées sur le panneau à 5 min les chromosomes étaient distants de 20,4 μm pour les deux conditions.

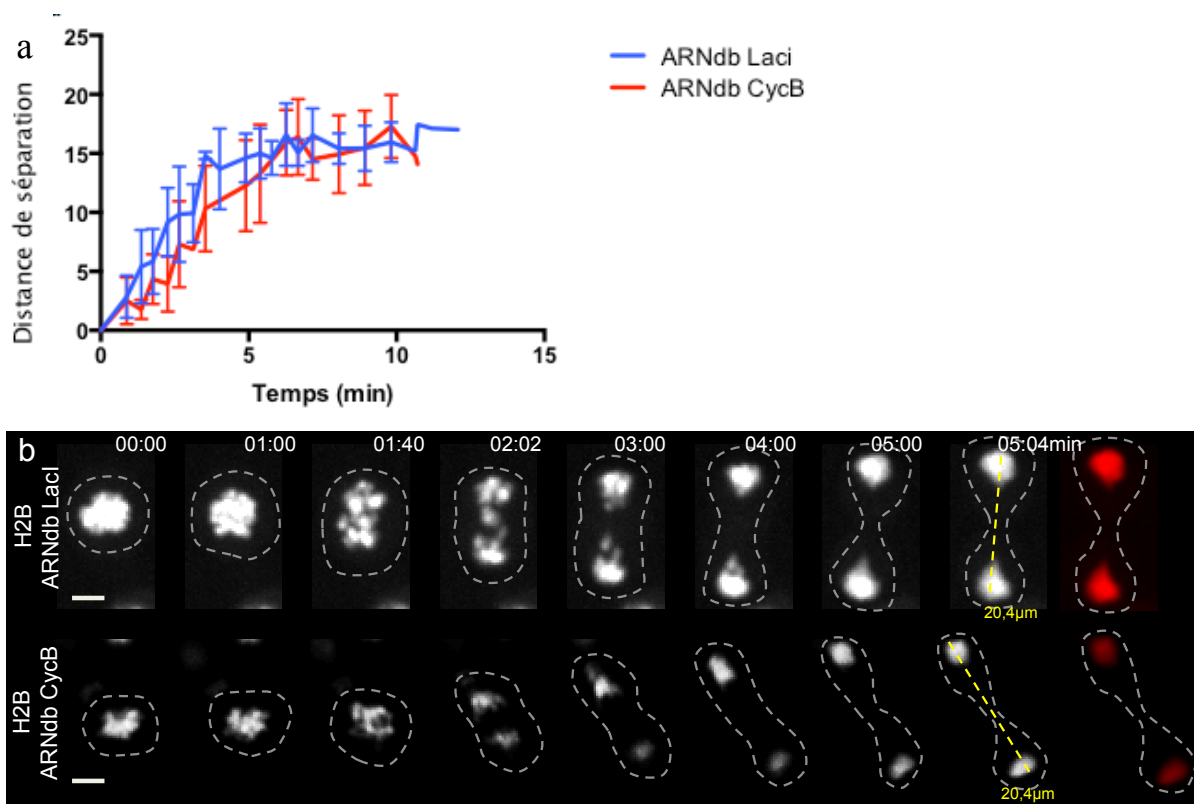


Figure 24 : **La perte de fonction de la cycline B endogène ne modifie pas la distance de ségrégation chromosomique.** a, Distance de séparation des chromosomes jusqu'à une distance maximale en fonction du temps sur cellules en présence d'ARNdb CycB ou LacI comme contrôle. b, Cellules exprimant H2B-mCh et Anilline-GFP, seule H2B-mCh est représenté pour un soucis de clarté, les cellule sont observées après 12h d'induction avec CuSO_4 - et 72h en présence d'ARNdb CycB ou LacI comme contrôle. La distance maximum est représentée par une barre oblique jaune. $n > 30$. Suivi sur 12h. Objectif 40x ; échelle 5 μm .

Durant cette première étape de l'étude il a été montré que la Cycline B est impliquée dans le processus de cytokinèse, en condition stable elle ralentit la contraction de l'anneau, allonge la ségrégation des chromosomes et induit dans de nombreux cas la formation de plusieurs anneaux. En revanche sa réduction d'expression n'a pas d'effet d'apparent.

La deuxième étape de l'étude a été menée sur le phénomène d'abscission, dernière phase de la cytokinèse. D'après certaines études notre hypothèse prévoyait une implication de la Cycline B au midbody tardif directe ou indirecte à travers le réseau protéique. De plus il est connu qu'elle agit en complexe avec Cdk1 en début de mitose jusqu'à la transition métaphase/anaphase. Il est donc également envisagé qu'elle agisse en synergie avec Cdk1 dans ce processus. Les expériences ont été menées de manière similaire par l'étude de gain et perte de fonction et sa localisation.

4.3 La Cycline B et l'abscission

4.3.1 La CycB-GFP a un comportement dynamique au midbody tardif

Dans un premier temps en vue de vérifier le comportement, la dynamique de la CycB-GFP et si cela n'est pas un artefact du à sa surexpression, des expériences de FRAP ont été menées (fig 25.a) suivi d'expériences d'immunofluorescences. Dans un premier temps notre hypothèse présagée un comportement dynamique de cette cycline en accord avec les comportements des protéines Shrub et Vps4 montrées en cellules de mammifères (Elia et al., 2011; Jouvenet et al., 2011) mais les expériences d'immunofluorescences réalisées n'ont donné aucun résultats probants.

Grâce à la technique de FRAP représentée en figure 9.a, des cellules ont été testée sur la CycB-GFP au midbody tardif, la cellule la plus optimale est d'abord montrée seule pour un souci de clarté. Les résultats obtenus ont montré un retour de la Cycline B des les premières secondes de 34,1% contre 1,5% pour l'Anilline après 10 minutes (fig 25.b). L'intensité a été retrouvée jusqu'à plus de 80%. Le retour d'intensité dans le panneau ci-dessous pour la même cellule (fig 25.c) a été observé. Ensuite, les résultats de quatre cellules ont été regroupés et représentés. Elles apparaissaient toutes avec une CycB-GFP au midbody tardif (fig 25.d), elles ont présenté un retour d'intensité jusqu'à 71% en moyenne pour la GFP. La zone de FRAP se limitait au midbody seul. La CycB a donc un comportement dynamique au midbody. Cela appuie l'hypothèse de son implication dans ce réseau protéique car elle correspond au comportement des protéines clés, Shrub et Vps4.

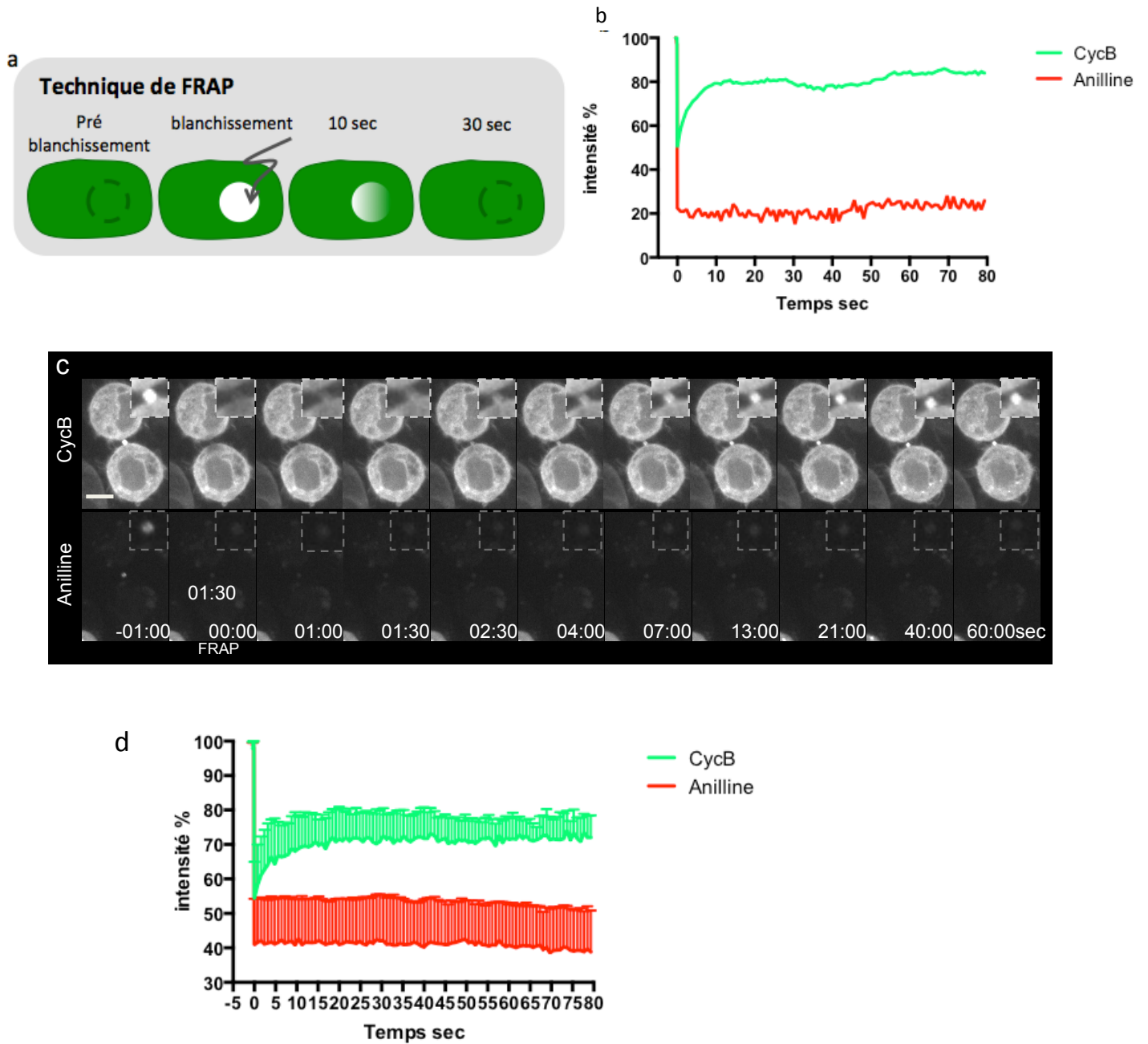


Figure 25 : **Comportement dynamique de la CycB au midbody.** a, représentation schématique de l'expérience FRAP sur une zone cellulaire sélectionnée. b, expérience de FRAP sur une cellule Anilline-mCh, CycB-GFP après 12h d'induction avec CuSO_4^- . Le laser a été réglé à 19% d'intensité pour la GFP. Le panneau inférieur (c) représente la même cellule avec le retour d'intensité représenté en zoom en haut à droite. d Total du retour d'intensité sur

4 cellules cumulées après des expériences de FRAP sur souche identique également à 19% d'intensité pour le laser. Objectif 63 x ; échelle 4 μ m.

4.3.2 La réduction d'expression de la cycline B endogène ne change pas le temps d'abscission

Des tests d'ARNdb ont été menés sur la souche Anilin-GFP, Tubuline-mCh, en premier lieu avec l'ARNdb Cyclin B. Notre hypothèse présagée un ralentissement de l'abscission en absence de Cycline B au vue de l'étude (Mathieu et al., 2013).

Le temps global d'abscission a été suivi, il correspond à la fin de contraction de l'anneau, la formation du midbody, jusqu'à la coupure physique entre les deux cellules. En condition d'ARNdb LacI la moyenne d'abscission était de 188 min, l'amplitude variée entre 60 et 390 min. En condition d'ARNdb CycB le temps d'abscission était en moyenne de 195 min avec une amplitude qui variée entre 45 et 720 min (fig 26.a). Il n'y a donc pas eu de différence significative entre les deux conditions (p -value < 0,2697), la réduction d'expression de la CycB endogène n'a pas induit de délai ni de phénotypes particuliers lors du phénomène d'abscission en effet les cellules (fig 26.b) ne montraient pas de comportements différents pour l'Anilline ou la tubuline avec la condition contrôle. En revanche une population non représentative (9%) à ce stade avait un temps d'abscission supérieur en condition d'ARNdb contre Cycline B.

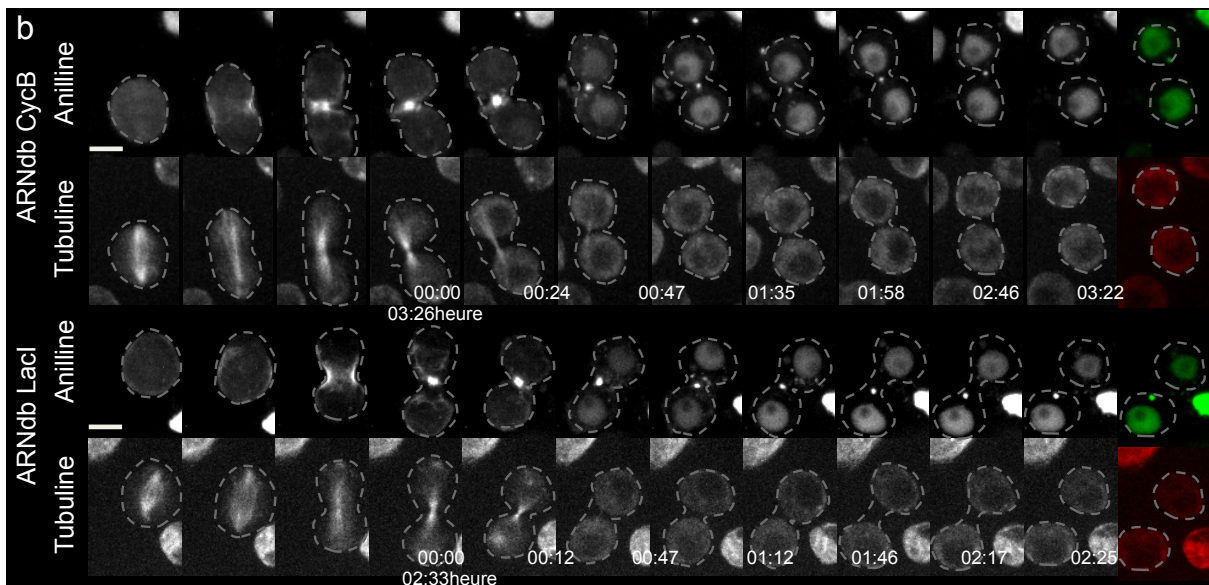
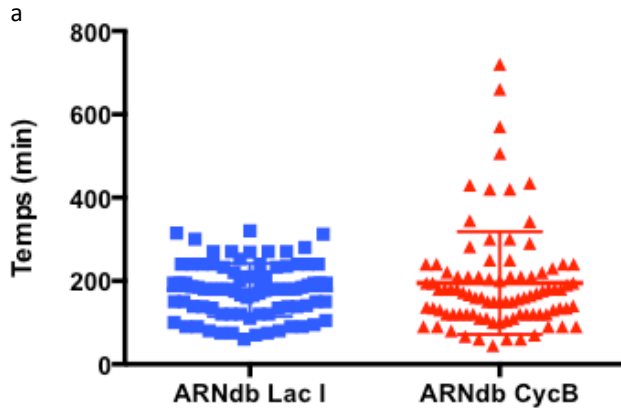


Figure 26 : **Temps d'abscission non modifié en présence d'ARNdb CycB.** a, Chaque point représente le temps d'abscission, de la formation du midbody jusqu'à la séparation des deux cellules filles, pour une cellule. b, Cellule exprimant Anillin-GFP et Tubuline-mCh, les cellules sont observées après 12h d'induction avec CuSO_4 - et 72h en présence d'ARNdb CycB ou LacI comme contrôle. $n > 60$. Suivi sur 24h. Objectif 40x ; échelle 5 μm .

A la vue des résultats la Cycline B n'a pas d'effet de délai sur l'abscission. En revanche il est connu que cette cycline en mitose agit en synergie avec Cdk1 car en complexe elles vont participer à l'inhibition de la ségrégation. C'est pourquoi en parallèle des expériences d'inhibition ont été menées sur la protéine Cdk1.

4.3.3 L'inhibition de Cdk1 provoque un délai dans l'abscission

Pour vérifier son implication dans l'abscission, Cdk1 a été inhibée spécifiquement. L'hypothèse prévoyait un délai dans le temps d'abscission. Pour cela l'inhibiteur a été utilisé sur une souche Aniline-GFP, Tubuline-mCh ainsi que CycB-GFP, Anillin-mCh et CycB^{stable}-GFP et Anillin-mCh pour déterminer si l'expression de la Cycline B endogène, de la CycB^{stable}-GFP et de la CycB-GFP pouvaient influencer le processus en absence de Cdk1. Sur la souche avec la cycline B endogène en présence de DMSO (contrôle) la moyenne d'abscission était de 410 minutes, en revanche une petite population, représentant 6% avait un temps supérieur à 1000 min d'abscission. Le temps n'a pu être définie avec précision car l'acquisition était de 1000 minutes. En présence de la drogue la population avec un temps supérieure à 1000 minutes était plus importante, 24%, la moyenne du temps d'abscission était de 728 min (fig 27.a). La différence observée était significative (p-value<0,0001). Les panneaux ci-dessous représentent les phénotypes d'abscission en présence de DMSO et de drogue (fig 27.b, c).

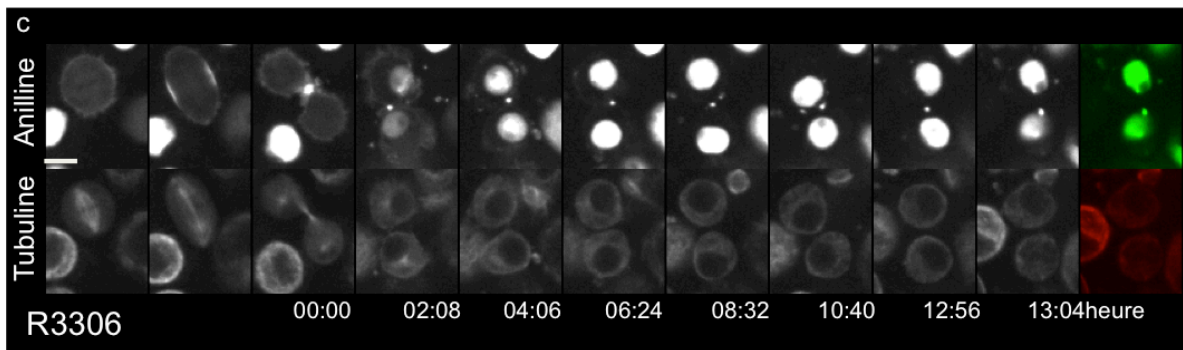
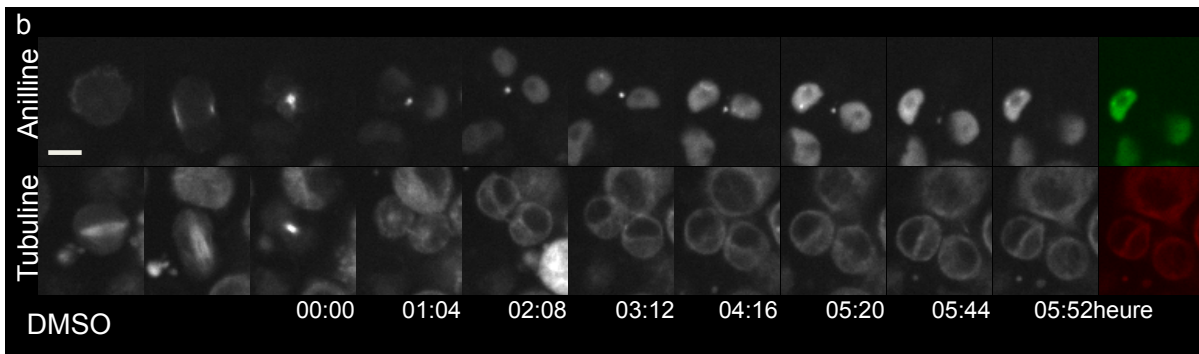
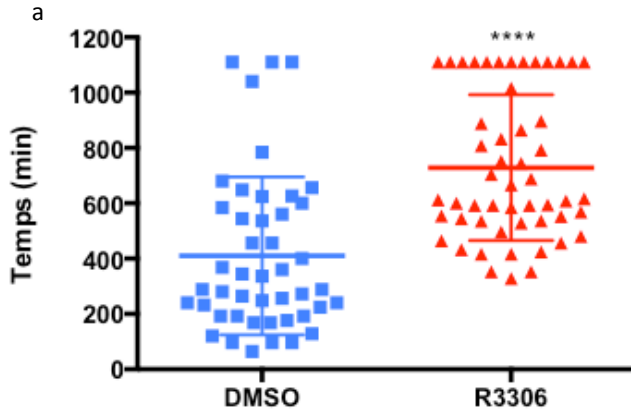
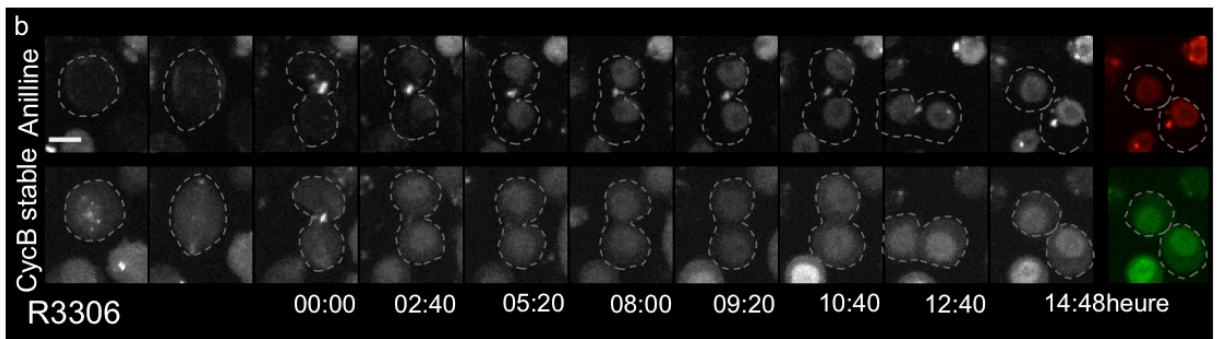
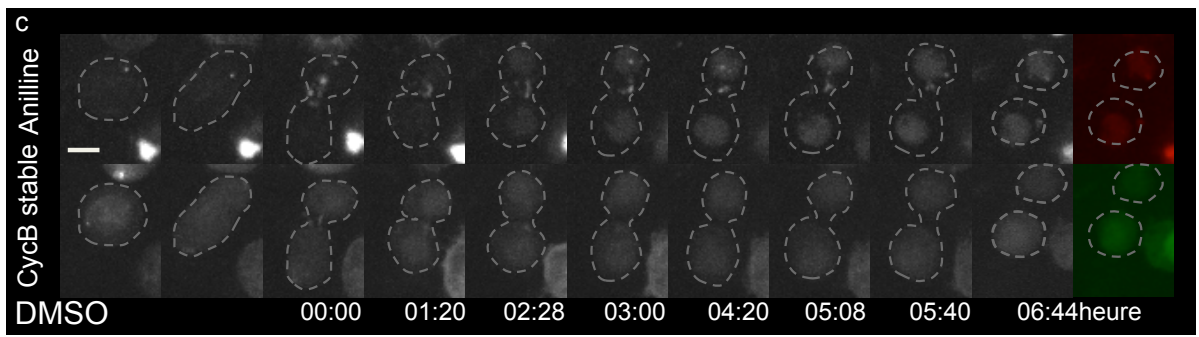
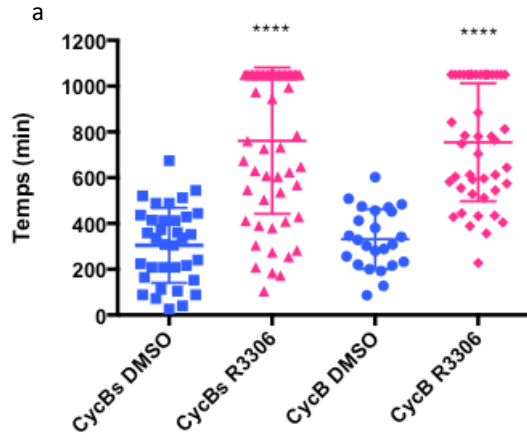


Figure 27 : Le temps d'abscission varie en présence d'inhibiteur de Cdk1. a, Chaque point représente le temps d'abscission, de la formation du midbody jusqu'à la séparation des deux cellules filles, pour une cellule. b et c, Cellule exprimant Anillin-GFP et Tubuline-mCh, les cellules sont observées après 12h d'induction avec CuSO_4 - et immédiatement après l'injection d'inhibiteur de Cdk1 (R3306) ou DMSO comme contrôle. $n > 50$. Suivi sur 24h. Objectif 40x ; échelle 5 μm .

Sur la souche CycB^{stable}-GFP l'hypothèse prévoyait un temps d'abscission retrouvé normal car durant l'expérience l'inhibition de Cdk1 est provoquée à la fin de la formation du midbody et cette protéine est produite constitutivement tout au long du cycle (Bloom and Cross, 2007; Schwob et al., 1994) or il serait donc possible que la CycB^{stable}-GFP puisse lier en complexe Cdk1 tout au long de la maturation du midbody (avant l'inhibition) et donc son inhibition serait empêchée en partie. Pour la souche CycB-GFP l'hypothèse prévoyait un délai comme pour les souches ayant juste la Cycline B endogène.

Les résultats obtenus indiquaient des données similaires (fig 28.a). En présence de DMSO la moyenne d'abscission était de 331 minutes pour la CycB-GFP et 304 minutes pour la CycB^{stable}-GFP. En présence de la drogue le temps moyen est passé à 761 minutes pour la CycB-GFP et 754 minutes pour la CycB^{stable}-GFP (p-value<0,0001). En condition d'inhibition de Cdk1 35% et 45 % respectivement des cellules avaient un temps d'abscission supérieur à 1000 minutes contre 0% en condition contrôle. Le phénotype a été accentué pour ces deux expériences mais il n'y a pas eu de différence de comportement de l'Anilline et des CycB-GFP et CycB^{stable}-GFP en présence ou non de drogue (fig 28.b et c).

De plus, à titre indicatif, on observe de la CycB^{stable}-GFP au temps 00:00 qui disparaît très rapidement. Toutes les cellules n'ont pas le même temps de maintien de la CycB^{stable}-GFP au midbody précoce, cela peut varier de quelques minutes à plus de 30 minutes. En revanche pour le CycB-GFP on observe qu'un très faible retour au midbody tardif mais ce retour représente 56,5% des cellules. Ici c'est l'effet de la drogue qui a été mit en évidence.



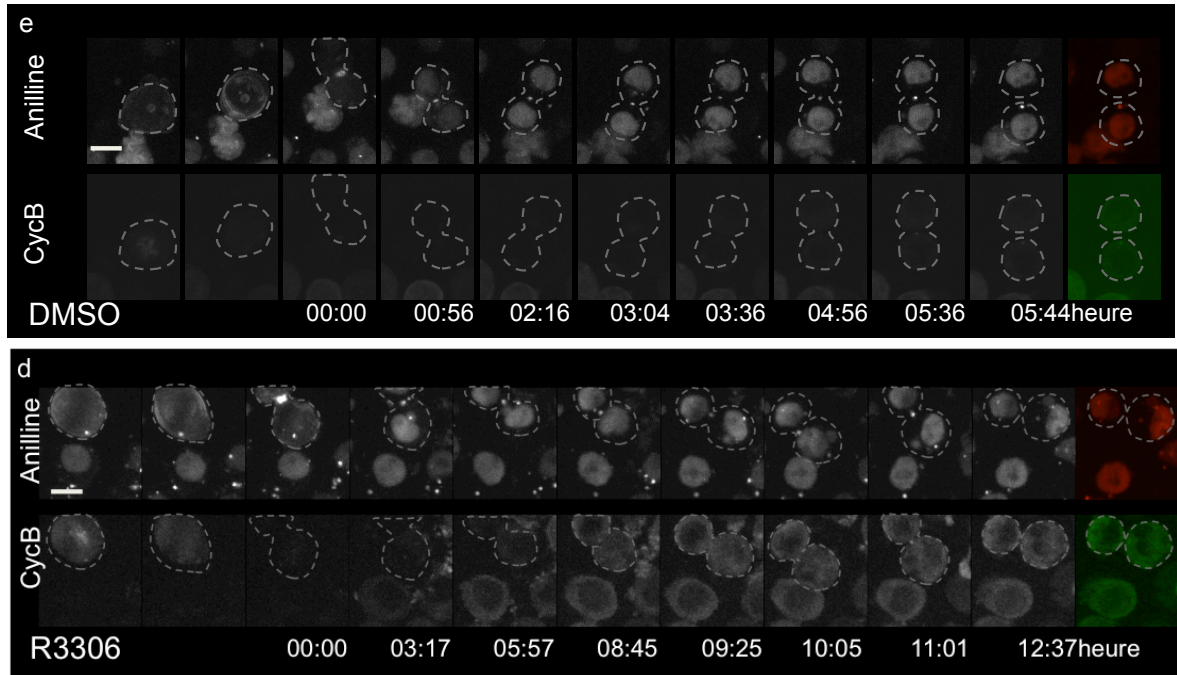


Figure 28 : **Le temps d'abscission varie en présence d'inhibiteur de Cdk1 sur souche avec $CycB^{stable}$ -GFP et CycB-GFP.** a, Chaque point représente le temps d'abscission, de la formation du midbody jusqu'à la séparation des deux cellules filles, pour une cellule. b à e, Cellule exprimant $CycB^{stable}$ -GFP, Anillin-mCh et CycB-GFP et Anillin-mCh, les cellules sont observées après 12h d'induction avec $CuSO_4$ - et immédiatement après l'injection d'inhibiteur de Cdk1 (R3306) ou DMSO comme contrôle. $n > 50$. Suivi sur 24h. Objectif 40x ; échelle 5 μm .

Cdk1 a donc un effet significatif sur le processus d'abscission ce qui n'est pas vérifié pour la Cycline B mais durant l'étude des expériences parallèles ont été menées sur les autres cyclines mitotiques A et B3 pour vérifier un possible effet redondant de Cdk1 en complexe avec ces cyclines.

4.3.4 La réduction d'expression de toutes les cyclines mitotiques ne change pas le temps d'abscission

En vue de déterminer si d'autres cyclines pourraient être impliquées dans ce délai de l'abscission avec Cdk1 et provoquer un phénomène de compensation des expériences de réduction d'expression sur les 3 cyclines mitotiques ont été réalisées. L'hypothèse prévoyait un effet accentué de délai d'abscission en cumulant les réductions d'expression, voir même des phénotypes sans abscission. Ces expériences ont été menées sur 8 combinaisons différentes ; ARNdb LacI, ARNdb CycA, ARNdb CycB, ARNdb CycB3, ARNdb CycA/B, ARNdb CycB/B3, ARNdb CycA/B3 et enfin ARNdb CycA/B/B3.

Le pourcentage de mitose a d'abord été suivi pour estimer le nombre de cellules qui pourraient présenter un phénotype de délai ou d'arrêt. Quelques soient les conditions il apparaît qu'en présence d'ARNdb de CycA il y a très peu eu de cellules en division ce qui confirme les études antérieures (Parry and O'Farrell, 2001) car la CycA est essentielle pour démarrer la mitose. Le nombre de cellules maximum qui se divisaient dans le champ cellulaire en présence d'ARNdb LacI a été utilisé comme le 100%, la norme, de cellules en division. En présence d'ARNdb contre la CycA seulement 20% se divisaient par rapport au contrôle, avec l'ARNdb contre la CycA et B 10%, CycA et B3 15% et CycA, B et B3 17%. C'est 4 conditions indiquaient une p-value globalement inférieure à 0,0002. En revanche en présence de l'ARNdb contre la CycB, CycB3 et CycB et B3 combinés il n'y a pas eu de différence avec le contrôle, respectivement 83%, 62%, 75% des cellules se divisaient (respectivement p-value<0,9791, p-value<0,1454 et p-value<0,4979). Il n'y a pas d'effet de la réduction d'expression des Cyclines B et B3 sur le processus de mitose (fig 29).

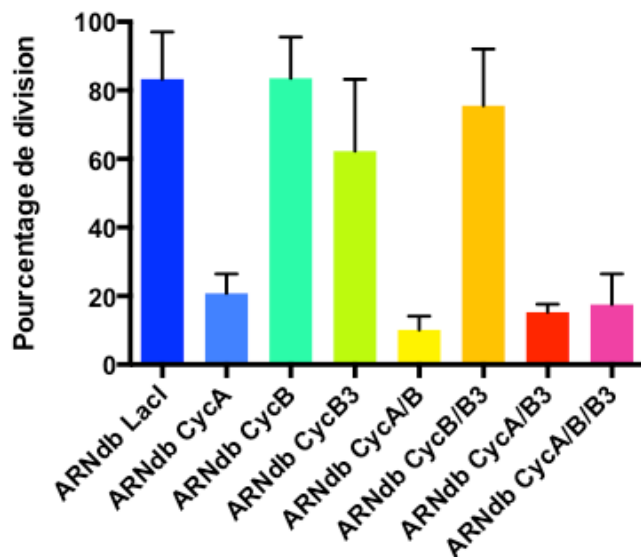


Figure 29 : **Faible taux de cellules entrant en division suite à la réduction d’expression de CycA.** Pourcentage de cellules exprimant Anillin-GFP et Tubuline-mCh après 12h d’induction avec CuSO₄- et 72h en présence des différents ARNdb des 3 cyclines mitotiques ; CycA, CycB et CycB3 ou LacI comme contrôle. La division correspond au départ de l’Anilline du noyau au cortex jusqu’à l’apparition du midbody. n > 30. Suivi sur 24h. Objectif 40x. N=3.

Les temps d’abscissions ont également été suivis. Sur toutes les cellules observées aucune différence de temps d’abscission n’a pu être ressortie. Pour chaque condition ; En présence d’ARNdb les temps d’abscission n’étaient pas significativement différents. Les conditions : ARNdb LacI, CycA, CycB, CycB3, CycA/B, CycB/B3, CycA/B3 et CycA/B/B3 présentaient des temps moyens de ; 373 min, 298 min, 430 min, 366 min, 488 min, 398 min, 327 min et 356 min. En moyenne l’abscission intervenait après 388 min (fig 30). L’absence de cycline B combinée à la réduction d’expression des autres cyclines mitotiques n’a pas eu d’effet apparent sur l’abscission. Elle n’en freine pas le temps comme prévu. Comme dans l’expérience précédente une faible population non représentative à ce stade a indiqué un temps plus long d’abscission en absence de cette cycline B mais 2 cellules présentaient cette caractéristique en condition contrôle.

La réduction d’expression des 3 cyclines n’a pas d’effet sur le temps d’abscission.

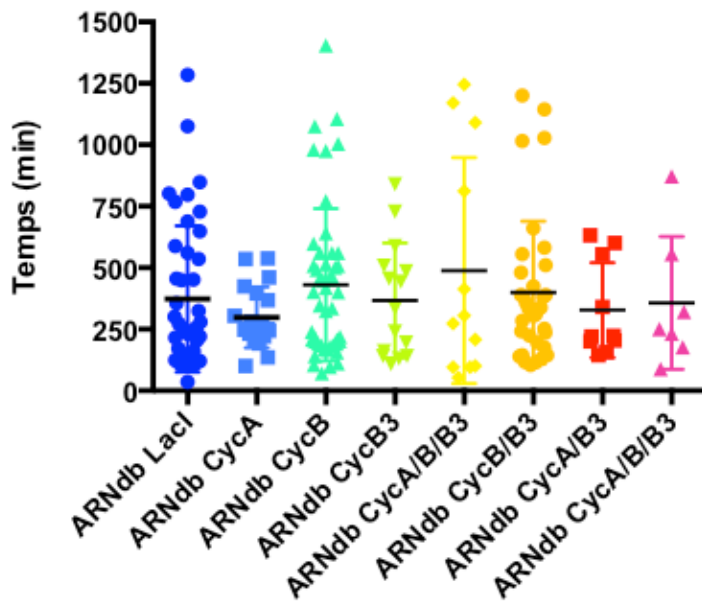


Figure 30 : **Le temps d'abscission ne varie pas de façon significative en présence d'ARNdb des cyclines mitotiques.** Chaque point représente le temps d'abscission, de la formation du midbody jusqu'à la séparation des deux cellules filles, pour une cellule. Après 12h d'induction avec CuSO_4 - et 72h en présence des différents ARNdb CycA/B/B3 ou LacI comme contrôle. P-value calculée en fonction du contrôle, respectivement ; $< 0,2978$; $< 0,3748$; $< 0,9402$; $< 0,3016$; $< 0,7028$; $< 0,6472$; $< 0,8912$. $n > 30$. Suivi sur 24h. Objectif 40x.

5 Discussion

Le processus de division cellulaire est commun à tous les organismes eucaryotes unicellulaires et pluricellulaires. Il dérive donc d'ancêtres communs très lointains, sa compréhension profonde est par conséquent fondamentale. Elle permet et permettra de comprendre l'évolution cellulaire et potentiellement de déterminer son devenir. Ce processus est très finement régulé et nécessite l'intervention importante d'un grand nombre de protéines, seules, en réseaux ou en complexes. Des défauts dans ce cycle et plus précisément dans les phases de mitose, cytokinèse et abscission peuvent engendrer de simples problèmes amenant à la correction ou engendrer des problèmes plus importants menant à la mort cellulaire ou à la prolifération anarchique, au cancer. C'est pourquoi cette étude vise à étendre les connaissances sur cette régulation du cycle à travers l'implication de la Cycline B notamment par sa dégradation dans le processus de cytokinèse, contraction de l'anneau et abscission, chez l'organisme *Drosophila melanogaster*.

5.1 La CycB-GFP est retrouvée au midbody tardif et la CycB-GFP stable est retrouvée au midbody précoce

Une observation a mis en évidence une localisation de la CycB-GFP et de la CycB^{stable}-GFP au midbody (fig. 16). Dans une souche marquée en Anillin-mCh et CycB-GFP la GFP est observée au midbody tardif jusqu'à l'abscission. observation confirmée chez des cellules HeLa avec la Cycline B2 (homologue de la Cycline B) (Mathieu et al., 2013). Elle apparaît après plusieurs heures et donc avec la maturation du midbody. A ce stade les cellules sont en phase G1 et il y a une resynthèse de nombreuses protéines et c'est donc un nouveau pool de Cycline B qui est observé dans plus de la moitié des cellules. Elle aurait donc un effet direct ou indirect sur le processus d'abscission. L'hypothèse est appuyée d'études antérieures

montrant un recrutement de la Cycline B au midbody chez l'embryon de Drosophile et chez les cellules HeLa (Mathieu et al., 2013).

Une des manières d'expliquer cette observation pourrait se faire à travers l'analyse du temps. En effet la présence de la CycB^{stable}-GFP au midbody tardif aurait pu ne pas être visible en raison du temps d'abscission plus court. Mais de récentes expériences non montrées ici car non reproductibles n'indiquent pas de différence de temps d'abscission en présence de CycB-GFP et CycB^{stable}-GFP. Il est donc difficile de conclure là-dessus.

Mais d'autres hypothèses sont envisageables. En effet la seule différence entre ces deux constructions de cyclines est la présence ou non de la boîte de destruction en N-terminale. Il est donc possible que l'absence de cette séquence puisse empêcher un recrutement direct ou indirect de la cycline au midbody c'est pourquoi de futures expériences seront menées sur des constructions avec les 200 premiers nucléotides du N-terminal couplés en GFP.

La présence transitoire de la CycB^{stable}-GFP au midbody précoce pourrait coïncider avec le comportement également transitoire d'Aurora B à ce point (Nguyen et al., 2005) comme décrite chez les cellules de mammifères (Mallampalli et al., 2013).. Il est possible d'envisager un lien entre ces deux protéines.

La CycB-GFP retrouvée au midbody tardif aurait un effet contraire à Aurora B et donc favoriserait l'abscission (Mathieu et al., 2013). Il serait donc intéressant d'observer une souche ayant les deux marquages d'Aurora B et de Cycline B et l'inhibition successive de chacun d'elles. Les expériences laissent présager un recrutement de ces deux protéines au midbody et la réduction d'expression respectivement une accélération et un ralentissement de l'abscission.

Au vue des résultats le comportement de la CycB-GFP a été testé par la techniques de FRAP (fig. 25) en vue de déterminer son dynamisme au midbody tardif. Le photo-blanchissement est réalisé sur la zone seule du midbody. On observe un retour d'intensité très rapide avec un retour proche de 80%. Il y a donc un roulement très rapide est important de la CycB-GFP au midbody. Il est donc possible qu'elle ai une action sur les structures du midbody et ai un effet d'accélérateur de l'abscission.

Pour vérifier si la Cycline B endogène est également présente au midbody tardif des expériences d'immunofluorescence ont été menées. Des marquages ont été fait pour l'Anilline, la Cycline B et l'ADN. Malheureusement l'anticorps anti-CycB, bien qu'assez spécifique en western blot, ne l'est pas en immunofluorescence car des signaux semblables ont été détectés dans les cellules en présence d'ARNdb contre CycB et dans les cellules contrôles et ces signaux étaient diffus. Cette expérience pourrait peut-être être réitérée en optimisant le mode de fixation des cellules et autres conditions.

De plus, On observe une différence de niveau d'intensité entre la CycB^{stable}-GFP et CycB-GFP au cours des expériences. Cela varie suivant les conditions et suivant l'état des lignées au moment de l'acquisition. Les résultats d'immunobuvardage confirment cette observation. Il est possible que lors de la transfection un nombre plus réduit de plasmides soient rentrer dans les cellules pour la construction CycB^{stable}-GFP, il est possible également que les cellules exprimant un trop haut niveau d'expression de CycB^{stable}-GFP ne soient pas viables contrairement à la CycB-GFP. Il est donc possible d'envisager des phénotypes plus variables en fonction de l'intensité d'expression. De telles constatations n'ont pas été observées.

Au vue de sa localisation la suite a menée à l'étude de tout le phénomène de cytokinèse en gain et perte de fonction.

5.2 La CycB endogène promeut le processus normal de contraction de l'anneau de cytokinèse par sa dégradation mais ne semble pas indispensable à celui-ci

5.2.1 La stabilisation de la Cycline B a un effet de frein sur la cytokinèse

La première phase de cette étude visait à observer et comprendre l'implication de la Cycline B à travers le processus de formation et contraction de l'anneau de cytokinèse. Cette étape a été divisée en deux axes d'études. Elle a tout d'abord été menée à travers le gain de fonction par l'utilisation de constructions spécifiques, la CycB-GFP stable qui sera non dégradée en mitose. La souche CycB-GFP n'est pas utilisée comme contrôle car elle n'était pas disponible au laboratoire lors de ces expériences.

En premier lieu, les temps de mitose ont été mesurés (fig 17 et 19). Au vu des études antérieures menées sur l'embryon (Parry and O'Farrell, 2001) un blocage de la cytokinèse et un ralentissement de la ségrégation à l'anaphase était prévu. Un ralentissement global de la mitose et de la contraction de l'anneau a été observé.

Il est à noter que les expériences ont été menées sur des souches ayant la Cycline B endogène, il était donc possible d'envisager une action de l'endogène par sa dégradation qui suffirait à induire la contraction de l'anneau malgré son niveau d'expression plus faible comparé à l'exogène ce qui aurait pu atténuer l'effet. Mais de récentes expériences similaires sur cette souche (non montrées ici car préliminaires) en présence d'ARNdb contre la Cycline B endogène ne changent pas les temps observés.

De plus, la condition contrôle correspond à une non induction de la CycB^{stable}-GFP or une expression basale est tout de même observée par microscopie mais non détectable par western blot, mais il est possible qu'une expression même très faible puisse augmenter le temps de mitose des cellules contrôles et atténuerait la différence de temps des 2 conditions. Néanmoins une augmentation significative est observée avec des phénotypes de multi-anneau et multi-midbody.

Dans les souches marquées en H2B-mCh et CycB^{stable}-GFP la ségrégation des chromosomes a été suivie (fig 20), la stabilisation de la Cycline B augmente la distance maximale entre les chromosomes en fonction du temps, du simple au double. Il est possible que la stabilisation de la cycline puisse provoquer un délai dans la levée du point de contrôle de la transition métaphase/anaphase (SAC). A contrario la dégradation de la Cycline B endogène dans cette souche même à un taux d'expression beaucoup plus faible que la CycB^{stable}-GFP puisse permettre néanmoins la ségrégation contrairement aux expériences dans l'embryon (Echard and O'Farrell, 2003).

A partir de ces résultats il est difficile de dire si le délai et les phénotypes observés sont induits par l'action de la CycB^{stable}-GFP sur la ségrégation des chromosomes et indirectement sur la cytokinèse via des signaux échangés entre les microtubules astraux et les premières protéines du réseau, ou si ils sont induits d'abord sur la cytokinèse et sont répercutés ensuite sur la ségrégation car c'est deux évènements sont intrinsèquement liés.

Néanmoins il est clairement visible que la Cycline B stable a un effet sur la cytokinèse qu'il soit direct ou indirect, les phénotypes observés donnant plusieurs anneaux contractiles et plusieurs midbody appuient cette observation. Il est donc possible que la Cycline B agisse sur la mise en place de l'anneau à travers le réseau protéique (fig.5). Mais à quel niveau ? Cela est encore inconnu. Il serait donc intéressant de suivre le comportement d'autres protéines essentielles à la cytokinèse à différents niveaux telles que les formines (Diaphanous), les septines, l'actine ou la myosine qui se retrouvent de l'anneau contractile jusqu'au midbody. On pourrait s'attendre à un défaut dans la mise en place et la contraction de l'anneau à travers le comportement de l'une d'elles.

Néanmoins, il est aussi possible d'envisager que le problème de la mise en place de l'anneau soit situé plus en amont, des expériences encore préliminaires menées sur des souches marquées en CycB^{stable}-GFP et tubuline-mCh montrent dans un grand nombre de cas un fuseau mitotique qui se sépare en trois parties au lieu de deux symétriques. Ce qui explique les phénotypes observés. Il pourrait donc y avoir un effet de la Cycline B au niveau de la signalisation entre le fuseau et les premières protéines du réseau recrutées comme Pebble et Rho. Mais ce phénotype pourrait aussi être du au maintenant du point de contrôle (SAC) qui

provoquerait une mauvaise élongation du fuseau à l'anaphase et donc un mauvais « dialogue » avec le réseau de cytotcinèse.

Pour cela il serait intéressant d'observer plus finement, à haute résolution le comportement du fuseau mitotique ainsi que les temps d'action mais cela reste compliqué au vue de la vitesse de cytotcinèse et de ségrégation sur ces cellules S2.

De plus d'autres intervenants peuvent rentrer en compte, notamment la Cycline B3 qui agit en fin d'anaphase et pourrait avoir un effet de compensation sur la perte de la Cycline B et donc induirait une cytotcinèse normale. Il serait donc intéressant d'inhiber la CycB et la CycB3 et de suivre l'évolution de la cytotcinèse.

5.2.2 La réduction d'expression de la Cycline B endogène n'a pas d'effet sur la cytotcinèse

L'étude a ensuite été menée sur la perte de fonction à travers l'utilisation d'ARNdb contre la cycline endogène sur une souche non marquée pour la Cycline mais pour l'Anillin-mCh, H2B-mCh et l'Anillin-GFP, Tubuline-mCh (fig 22 et 23). Au vue des études antérieures dans l'embryon on s'attendait à observer une accélération de la cytotcinèse et une possible accélération de la ségrégation ce qui n'a pas été le cas en cellules S2.

Contrairement au gain de fonction, en perte de fonction il n'y a pas d'effets significatifs observés. Les distances de ségrégation et les temps de contraction de l'anneau sont inchangés malgré l'effet prouvé de l'ARNdb sur la Cycline B (fig.21) mais il est possible qu'une expression basale soit présente mais indétectable comme présenté précédemment pour la CycB^{stable}-GFP. De plus, des expériences avec des ARNdb contre les trois cyclines mitotiques en plusieurs combinaisons ont été menées. Elles ne sont pas présentées ici par manque de cellule lors des expériences et car la souche n'a jamais été très stable et donc difficile à observer. Mais les résultats obtenus n'indiquent pas de différences de temps de contraction de l'anneau même en inhibant les trois cyclines sur les cellules S2. Il est également possible que l'ARNdb utilisé bien que semblant efficace en western pourrait ne pas être assez efficace pour voir un phénotype. Une des manières de vérifier et de créer un KO génétique. L'utilisation du

système CRISPR-Cas9 pourrait être envisagée. Ce système a déjà été testé et plus de 85% des cellules de la lignée présentent une mutation homozygote spécifique (Bassett et al., 2014).

Il est possible que sans cette cycline, Cdk1 soit inactive et que cela favorise une ségrégation plus rapide qui serait potentiellement compensée par l'action du point de contrôle sur la séparation des centrosomes et l'action du gradient de phosphorylation d'Aurora B sur les kinétochores. Il serait intéressant d'observer le comportement des chromosomes et voir si la répartition se fait de manière homogène ou si il y a induction de dommages en suivant des protéines spécifiques telle que rad51.

Le suivi de la ségrégation (fig 24), de la distance maximale entre les chromosomes en fonction du temps n'indiquent pas d'effet en l'absence de la Cycline B endogène. Les distances et les temps sont équivalents dans les deux conditions. Encore une fois cela n'indique pas la bonne répartition de l'ADN. En objectif 40x le marquage d'H2B ne permet pas de déterminer finement la répartition. Des études pourraient être menées en haute résolution.

La perte de fonction de cette cycline en cellules S2 ne montre pas d'effet sur la cytokinèse, la cellule peut donc se sortir de la mitose sans dommage apparent. Il est donc possible que la cycline par sa dégradation induise une signalisation directe ou indirecte dans la mise en place du réseau de cytokinèse à la transition métaphase/anaphase mais en réduction d'expression sa dégradation n'est plus nécessaire car elle est déjà absente.

De plus, il est à noter que les cellules S2 sont particulièrement résistantes aux conditions environnementales et que des expériences similaires menées sur d'autres types cellulaires telle que les mammifères pourraient donner des résultats plus significatifs.

5.3 La CycB est présente au midbody mais ne semble pas avoir de rôle significatif durant le processus d'abscission

Suite aux résultats obtenus pour les premières étapes de la cytokinèse, l'étude de l'implication de la Cycline B au processus d'abscission a été menée. Elle a été réalisée également à travers un axe, la perte de fonction sur une souche Anilline-GFP et Tubuline-mCh car en gain de fonction la CycB^{stable}-GFP n'est pas retrouvée. La perte de fonction laissée envisager un délai dans le temps d'abscission. Pour cela les ARNdb ont été utilisés.

Les observations de temps n'indiquent aucun effet de l'inhibition de la Cycline B endogène sur l'abscission (fig 26). Seulement certaines cellules montrent un temps beaucoup plus long mais elles ne représentent pas une population significative. Il serait intéressant d'augmenter le nombre de cellule pour observer une possible population distincte. Mais même dans ce cas l'effet serait minime. Il se pourrait que sa présence au midbody tardif et sa dynamique soit aspécifique ou que son absence soit compensée par un réseau protéique autre. Il est également possible qu'elle soit en compétition avec une autre protéine de la régulation.

Les observations réalisées en microscopie n'indiquent pas de différences de morphologie significative au midbody. Mais c'est un corps très dense et des expériences en haute résolution pourraient apporter plus de réponse.

La Cycline B ne semble donc pas avoir d'effet sur l'abscission malgré son recrutement. En revanche il serait intéressant d'approfondir le comportement du midbody en présence de la construction de la boîte de destruction seule couplée en GFP et de suivre des protéines telle que Vsp4 et Shrub dans ce processus. On pourrait attendre une structure différente de ces protéines sous l'action indirecte de cette partie N-terminale.

5.4 Cdk1 promeut l'abscission

La Cycline B est active en complexe avec Cdk1 et par sa dégradation permet la transition métaphase/anaphase. L'hypothèse présageait un rôle de Cdk1 dans ce processus. Donc parallèlement aux expériences précédentes, d'autres ont été menées par l'inhibition de Cdk1 sur des souches Anillin-GFP, Tubuline-mCh ; CycB^{stable}-GFP, Anillin-mCh ; CycB-GFP, Anillin-mCh.

Les temps d'abscission ont été observés et un délai significatif en présence d'inhibiteur de la CDK1 est observé, le temps est doublé (fig 27). Cependant il n'y a pas de différence d'effet que la Cycline B stable soit présente ou non. Les résultats indiquent donc une action claire de Cdk1 dans ce processus contrairement à la Cycline B. Elle pourrait agir seule ou en complexe avec une autre protéine dans ce processus. En revanche il n'y a pas de différence de morphologie apparente des cellules et du midbody. Cdk1 aurait donc un rôle direct ou indirect dans l'abscission et pourrait induire une certaine régulation des protéines Vps4 et Shrub. Il serait donc intéressant de suivre ces protéines spécifiques de l'abscission en présence d'inhibiteur en haute résolution et de suivre par la suite Cdk1 marquée en GFP (construction nouvellement disponible au laboratoire). Cela pourrait montrer un recrutement différent ou simplement un délai. De plus, aucune différence visible n'est observée sur le temps d'abscission en présence ou non de CycB-GFP au midbody tardif. Mais cela mérite d'être approfondi et mesuré.

Il était également possible que d'autres cyclines notamment la A et la B3 puissent être impliquées dans ce processus d'abscission avec Cdk1 et puissent compenser d'une certaine manière car ces cyclines sont resynthétisées en phase G1 donc avant l'abscission. C'est pourquoi des expériences en présence d'ARNdb de ces trois cyclines ont été menées et en présence de différentes combinaisons d'ARNdb il n'y a pas de différence de temps d'abscission observée. En revanche un petit nombre de cellules en absence de Cycline B se détachent et indiquent un temps d'abscission plus long mais non significatif.

De plus, il reste à déterminer si l'effet significatif est réel. En effet il est possible que la drogue utilisée ne soit pas assez spécifique et puisse induire une inhibition d'autre kinase comme Cdk4 du cycle. Cela nécessite d'autres test par d'autres drogues comme la Roscovitine et si les phénotypes observés sont reproduits.

Ces phénotypes observés sont réellement intéressant et méritent d'être vraiment approfondis.

5.5 Perspectives et futures expériences

Même si le rôle de la Cycline B à la cytokinèse et à l'abscission n'est pas clairement établi après cette étude, des expériences d'approfondissement pourrait être réalisées. La présence de la CycB-GFP au midbody tardif contrairement à la CycB^{stable}-GFP pourrait indiquer un rôle de la boite de destruction dans ce processus, dans le recrutement ou dans la fonction. C'est pourquoi un mutant à été créé au laboratoire (voir matériels et méthodes), qui correspond à la boite de destruction seule couplée à la protéine GFP. Il serait intéressant de suivre son comportement à l'abscission dans la même souche que la CycB^{stable}-GFP. On pourrait observer un recrutement de la boite de destruction seule au midbody et cela indiquerait un rôle encore inconnue pour cette séquence.

Cette construction pourrait également être suivie en parallèle avec la protéine recombinante de Cdk1 disponible au laboratoire (voir matériels et méthodes). Les résultats ont indiqué un rôle de Cdk1 au midbody à l'abscission l'étude du comportement de Cdk1 vis à vis de la boite de destruction pourrait être un grand intérêt. Cet axe pourrait aussi être mené avec la CycB-GFP. Les résultats pourraient nous indiquer un rôle, une formation de ce complexe en dehors des phases de mitose ou un rôle autre pour Cdk1 en dehors du complexe, liée ou non à d'autres protéines.

Un autre aspect viserait à étudier les protéines de l'abscission, Shrub et VPS4 avec les constructions Cdk1 et CycB-GFP. Il serait intéressant de tester le comportement des ces protéines, en effet cela nous indiquerait si le potentiel complexe Cdk1/CycB ou Cdk1 seule a une conséquence sur le comportement de Shrub ou VPS4. Ces protéines ont été transfectées en souche et leurs ARNdb sont disponibles (tableau annexe 6 et 7).

6 Conclusion

Le but de cette étude était de caractériser la fonction de la Cycline B au processus de cytokinèse et d'abscission. En effet il est déjà connu et prouvé qu'elle joue un rôle prépondérant dans la mitose par son action dans le complexe Cdk1/CycB. Sa dégradation permet la poursuite de la métaphase en anaphase et donc la ségrégation des chromosomes.

Les résultats obtenus indiquent un rôle potentiel dans la mise en place du fuseau car lorsqu'elle est maintenue, plusieurs anneaux contractiles sont présents et forment donc plusieurs midbody mais son absence n'a pas d'effet apparent sur la cytokinèse.

De plus, cette Cycline étant dégradée à la mitose des observations ont pu démontrer sa présence au midbody tardif. Elle semble revenir après quelques heures suite à la formation du midbody et a un comportement dynamique ce qui n'est pas le cas pour la Cycline B stable qui ne réapparaît pas.

Pour autant son action dans l'abscission n'a pas pu être démontrée malgré sa présence. En revanche une autre protéine a émergé par son action dans le processus d'abscission. Cdk1 semble avoir un effet significatif. Avec son inhibition un délai est induit à l'abscission.

Il est donc possible que cette cycline est une action sur la formation de l'anneau et possiblement en amont du réseau protéique de la cytokinèse, parallèlement la protéine Cdk1 pourrait avoir un rôle dans le réseau protéique de l'abscission.

7 Bibliographie

Afonso, D.J.S., Liu, D., Machado, D.R., Pan, H., Jepson, J.E.C., Rogulja, D., and Koh, K. (2015). TARANIS Functions with Cyclin A and Cdk1 in a Novel Arousal Center to Control Sleep in *Drosophila*. *Curr. Biol.* *CB 25*, 1717–1726.

Amano, M., Nakayama, M., and Kaibuchi, K. (2010). Rho-Kinase/ROCK: A Key Regulator of the Cytoskeleton and Cell Polarity. *Cytoskelet.* Hoboken Nj *67*, 545–554.

Bassett, A.R., Tibbit, C., Ponting, C.P., and Liu, J.-L. (2014). Mutagenesis and homologous recombination in *Drosophila* cell lines using CRISPR/Cas9. *Biol. Open* *3*, 42–49.

Bastos, R.N., and Barr, F.A. (2010). Plk1 negatively regulates Cep55 recruitment to the midbody to ensure orderly abscission. *J. Cell Biol.* *191*, 751–760.

Beach, D., Durkacz, B., and Nurse, P. (1982). Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast. *Nature* *300*, 706–709.

Beckingham, K.M., Armstrong, J.D., Texada, M.J., Munjaal, R., and Baker, D.A. (2005). *Drosophila melanogaster*--the model organism of choice for the complex biology of multicellular organisms. *Gravitational Space Biol. Bull. Publ. Am. Soc. Gravitational Space Biol.* *18*, 17–29.

Bloom, J., and Cross, F.R. (2007). Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 149–160.

Brown, N.R., Korolchuk, S., Martin, M.P., Stanley, W.A., Moukhametzianov, R., Noble, M.E.M., and Endicott, J.A. (2015). CDK1 structures reveal conserved and unique features of the essential cell cycle CDK. *Nat. Commun.* *6*, 6769.

Cabernard, C. (2012). Cytokinesis in *Drosophila melanogaster*. *Cytoskelet.* Hoboken NJ *69*, 791–809.

Charrier-Savournin, F.B., Château, M.-T., Gire, V., Sedivy, J., Piette, J., and Dulić, V. (2004). p21-Mediated Nuclear Retention of Cyclin B1-Cdk1 in Response to Genotoxic Stress. *Mol. Biol. Cell* *15*, 3965–3976.

Chen, Q., and Pollard, T.D. (2011). Actin filament severing by cofilin is more important for assembly than constriction of the cytokinetic contractile ring. *J. Cell Biol.* *195*, 485–498.

Chesnel, F., Bazile, F., Pascal, A., and Kubiak, J.Z. (2007). Cyclin B2/cyclin-dependent kinase1 dissociation precedes CDK1 Thr-161 dephosphorylation upon M-phase promoting factor inactivation in *Xenopus laevis* cell-free extract. *Int. J. Dev. Biol.* *51*, 297–305.

- Cooper, G.M. (2000). *The Eukaryotic Cell Cycle*.
- Datar, S.A., Jacobs, H.W., de la Cruz, A.F.A., Lehner, C.F., and Edgar, B.A. (2000). The *Drosophila* Cyclin D–Cdk4 complex promotes cellular growth. *EMBO J.* *19*, 4543–4554.
- D’Avino, P.P., Takeda, T., Capalbo, L., Zhang, W., Lilley, K.S., Laue, E.D., and Glover, D.M. (2008). Interaction between Anillin and RacGAP50C connects the actomyosin contractile ring with spindle microtubules at the cell division site. *J. Cell Sci.* *121*, 1151–1158.
- Echard, A., and O’Farrell, P.H. (2003). The degradation of two mitotic cyclins contributes to the timing of cytokinesis. *Curr. Biol. CB* *13*, 373–383.
- Elad, N., Abramovitch, S., Sabanay, H., and Medalia, O. (2011). Microtubule organization in the final stages of cytokinesis as revealed by cryo-electron tomography. *J. Cell Sci.* *124*, 207–215.
- El Amine, N., Kechad, A., Jananji, S., and Hickson, G.R.X. (2013). Opposing actions of septins and Sticky on Anillin promote the transition from contractile to midbody ring. *J. Cell Biol.* *203*, 487–504.
- Elia, N., Sougrat, R., Spurlin, T.A., Hurley, J.H., and Lippincott-Schwartz, J. (2011). Dynamics of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery during cytokinesis and its role in abscission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 4846–4851.
- Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* *33*, 389–396.
- Fededa, J.P., and Gerlich, D.W. (2012). Molecular control of animal cell cytokinesis. *Nat. Cell Biol.* *14*, 440–447.
- Foster, D.A., Yellen, P., Xu, L., and Saqena, M. (2010). Regulation of G1 Cell Cycle Progression. *Genes Cancer* *1*, 1124–1131.
- Founounou, N., Loyer, N., and Le Borgne, R. (2013). Septins regulate the contractility of the actomyosin ring to enable adherens junction remodeling during cytokinesis of epithelial cells. *Dev. Cell* *24*, 242–255.
- Glotzer, M., Murray, A.W., and Kirschner, M.W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* *349*, 132–138.
- Green, R.A., Paluch, E., and Oegema, K. (2012). Cytokinesis in animal cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *28*, 29–58.
- Gregan, J., Polakova, S., Zhang, L., Tolić-Nørrelykke, I.M., and Cimini, D. (2011). Merotelic kinetochore attachment: causes and effects. *Trends Cell Biol.* *21*, 374–381.

- Guardavaccaro, D., and Pagano, M. (2006). Stabilizers and destabilizers controlling cell cycle oscillators. *Mol. Cell* 22, 1–4.
- Guertin, D.A., Trautmann, S., and McCollum, D. (2002). Cytokinesis in Eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 155–178.
- Hara, M., Abe, Y., Tanaka, T., Yamamoto, T., Okumura, E., and Kishimoto, T. (2012). Greatwall kinase and cyclin B-Cdk1 are both critical constituents of M-phase-promoting factor. *Nat. Commun.* 3, 1059.
- Harashima, H., Dissmeyer, N., and Schnittger, A. (2013). Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends Cell Biol.* 23, 345–356.
- Hartley, J.L., Temple, G.F., and Brasch, M.A. (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res.* 10, 1788–1795.
- Hartwell, L.H. (1974). *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriol. Rev.* 38, 164–198.
- Hershko, A. (1999). Mechanisms and regulation of the degradation of cyclin B. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 354, 1571–1575; discussion 1575–1576.
- Hill, C.P., and Babst, M. (2012). Structure and function of the membrane deformation AAA ATPase Vps4. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 172–181.
- Hohegger, H., Dejsuphong, D., Sonoda, E., Saberi, A., Rajendra, E., Kirk, J., Hunt, T., and Takeda, S. (2007). An essential role for Cdk1 in S phase control is revealed via chemical genetics in vertebrate cells. *J. Cell Biol.* 178, 257–268.
- Hu, C.-K., Coughlin, M., and Mitchison, T.J. (2012). Midbody assembly and its regulation during cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* 23, 1024–1034.
- Jeong, A.L., and Yang, Y. (2013). PP2A function toward mitotic kinases and substrates during the cell cycle. *BMB Rep.* 46, 289–294.
- Jouvenet, N., Zhadina, M., Bieniasz, P.D., and Simon, S.M. (2011). Dynamics of ESCRT protein recruitment during retroviral assembly. *Nat. Cell Biol.* 13, 394–401.
- Kabeche, L., and Compton, D.A. (2013). Cyclin A regulates kinetochore microtubules to promote faithful chromosome segregation. *Nature* 502, 110–113.
- Kachaner, D., Pinson, X., El Kadhi, K.B., Normandin, K., Talje, L., Lavoie, H., Lépine, G., Carréno, S., Kwok, B.H., Hickson, G.R., et al. (2014). Interdomain allosteric regulation of Polo kinase by Aurora B and Map205 is required for cytokinesis. *J. Cell Biol.* 207, 201–211.
- Kao, L.-R., and Megraw, T.L. (2004). RNAi in Cultured *Drosophila* Cells. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 247, 443–457.

- Kechad, A., Jananji, S., Ruella, Y., and Hickson, G.R.X. (2012). Anillin acts as a bifunctional linker coordinating midbody ring biogenesis during cytokinesis. *Curr. Biol. CB* 22, 197–203.
- Lees, E.M., and Harlow, E. (1993). Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase. *Mol. Cell. Biol.* 13, 1194–1201.
- Lehner, C.F., and O’Farrell, P.H. (1990). The Roles of Drosophila Cyclins A and B in Mitotic Control. *Cell* 61, 535–547.
- Liu, J., and Kipreos, E.T. (2000). Evolution of cyclin-dependent kinases (CDKs) and CDK-activating kinases (CAKs): differential conservation of CAKs in yeast and metazoa. *Mol. Biol. Evol.* 17, 1061–1074.
- Ma, Z., Wu, Y., Jin, J., Yan, J., Kuang, S., Zhou, M., Zhang, Y., and Guo, A.-Y. (2013). Phylogenetic analysis reveals the evolution and diversification of cyclins in eukaryotes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 66, 1002–1010.
- Mahmood, T., and Yang, P.-C. (2012). Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North Am. J. Med. Sci.* 4, 429–434.
- Mallampalli, R.K., Glasser, J.R., Coon, T.A., and Chen, B.B. (2013). Calmodulin protects Aurora B on the midbody to regulate the fidelity of cytokinesis. *Cell Cycle Georget. Tex* 12, 663–673.
- Malmanche, N., Maia, A., and Sunkel, C.E. (2006). The spindle assembly checkpoint: preventing chromosome mis-segregation during mitosis and meiosis. *FEBS Lett.* 580, 2888–2895.
- Mathieu, J., Cauvin, C., Moch, C., Radford, S.J., Sampaio, P., Perdigoto, C.N., Schweisguth, F., Bardin, A.J., Sunkel, C.E., McKim, K., et al. (2013). Aurora B and cyclin B have opposite effects on the timing of cytokinesis abscission in Drosophila germ cells and in vertebrate somatic cells. *Dev. Cell* 26, 250–265.
- Matias, N.R., Mathieu, J., and Huynh, J.-R. (2015). Abscission Is Regulated by the ESCRT-III Protein Shrub in Drosophila Germline Stem Cells. *PLoS Genet.* 11.
- Mendes Pinto, I., Rubinstein, B., Kucharavy, A., Unruh, J.R., and Li, R. (2012). Actin depolymerization drives actomyosin ring contraction during budding yeast cytokinesis. *Dev. Cell* 22, 1247–1260.
- Meserve, J.H., and Duronio, R.J. (2015). Scalloped and Yorkie are required for cell cycle re-entry of quiescent cells after tissue damage. *Dev. Camb. Engl.* 142, 2740–2751.
- Miller, A.L. (2011). The contractile ring. *Curr. Biol.* 21, R976–R978.

Mishima, M., Kaitna, S., and Glotzer, M. (2002). Central spindle assembly and cytokinesis require a kinesin-like protein/RhoGAP complex with microtubule bundling activity. *Dev. Cell* 2, 41–54.

Morgan, D.O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 261–291.

Morita, E., Colf, L.A., Karren, M.A., Sandrin, V., Rodesch, C.K., and Sundquist, W.I. (2010). Human ESCRT-III and VPS4 proteins are required for centrosome and spindle maintenance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 12889–12894.

Moser, B.A., and Russell, P. (2000). Cell cycle regulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 631–636.

Mullins, J.M., and Biesele, J.J. (1977). Terminal phase of cytokinesis in D-98s cells. *J. Cell Biol.* 73, 672–684.

Neto, H., and Gould, G.W. (2011). The regulation of abscission by multi-protein complexes. *J. Cell Sci.* 124, 3199–3207.

Nguyen, H.G., Chinnappan, D., Urano, T., and Ravid, K. (2005). Mechanism of Aurora-B degradation and its dependency on intact KEN and A-boxes: identification of an aneuploidy-promoting property. *Mol. Cell. Biol.* 25, 4977–4992.

Norden, C., Mendoza, M., Dobbelaere, J., Kotwaliwale, C.V., Biggins, S., and Barral, Y. (2006). The NoCut pathway links completion of cytokinesis to spindle midzone function to prevent chromosome breakage. *Cell* 125, 85–98.

Ohkumo, T., Masutani, C., Eki, T., and Hanaoka, F. (2008). Use of RNAi in *C. elegans*. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 442, 129–137.

Parry, D.H., and O’Farrell, P.H. (2001). The schedule of destruction of three mitotic cyclins can dictate the timing of events during exit from mitosis. *Curr. Biol. CB* 11, 671–683.

Peters, J.-M. (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol. Cell* 9, 931–943.

Petronczki, M., Glotzer, M., Kraut, N., and Peters, J.-M. (2007). Polo-like kinase 1 triggers the initiation of cytokinesis in human cells by promoting recruitment of the RhoGEF Ect2 to the central spindle. *Dev. Cell* 12, 713–725.

Piekny, A.J., and Glotzer, M. (2008). Anillin is a scaffold protein that links RhoA, actin, and myosin during cytokinesis. *Curr. Biol. CB* 18, 30–36.

Raleigh, J.M., and O’Connell, M.J. (2000). The G(2) DNA damage checkpoint targets both Wee1 and Cdc25. *J. Cell Sci.* 113 (*Pt 10*), 1727–1736.

- Rappaport, R. (2005). *Cytokinesis in Animal Cells* (Cambridge University Press).
- Reymann, A.-C., Boujemaa-Paterski, R., Martiel, J.-L., Guérin, C., Cao, W., Chin, H.F., De La Cruz, E.M., Théry, M., and Blanchoin, L. (2012). Actin network architecture can determine myosin motor activity. *Science* 336, 1310–1314.
- Schwob, E., Böhm, T., Mendenhall, M.D., and Nasmyth, K. (1994). The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell* 79, 233–244.
- Sipiczki, M. (2000). Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome Biol.* 1, reviews1011.1–reviews1011.4.
- Sit, S.-T., and Manser, E. (2011). Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 124, 679–683.
- Somers, W.G., and Saint, R. (2003). A RhoGEF and Rho family GTPase-activating protein complex links the contractile ring to cortical microtubules at the onset of cytokinesis. *Dev. Cell* 4, 29–39.
- Steigemann, P., and Gerlich, D.W. (2009). Cytokinetic abscission: cellular dynamics at the midbody. *Trends Cell Biol.* 19, 606–616.
- Steigemann, P., Wurzenberger, C., Schmitz, M.H.A., Held, M., Guizetti, J., Maar, S., and Gerlich, D.W. (2009). Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization. *Cell* 136, 473–484.
- Strausfeld, U., Labbé, J.C., Fesquet, D., Cavadore, J.C., Picard, A., Sadhu, K., Russell, P., and Dorée, M. (1991). Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein. *Nature* 351, 242–245.
- Sveiczer, A., Csikasz-Nagy, A., Gyorffy, B., Tyson, J.J., and Novak, B. (2000). Modeling the fission yeast cell cycle: Quantized cycle times in *wee1- cdc25Δ* mutant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 7865–7870.
- Sweeney, N.T., Brenman, J.E., Jan, Y.N., and Gao, F.-B. (2006). The coiled-coil protein shrub controls neuronal morphogenesis in *Drosophila*. *Curr. Biol. CB* 16, 1006–1011.
- Thoresen, S.B., Campsteijn, C., Vietri, M., Schink, K.O., Liestøl, K., Andersen, J.S., Raiborg, C., and Stenmark, H. (2014). ANCHR mediates Aurora-B-dependent abscission checkpoint control through retention of VPS4. *Nat. Cell Biol.* 16, 550–560.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 4350–4354.
- Vaccari, T., Rusten, T.E., Menut, L., Nezis, I.P., Brech, A., Stenmark, H., and Bilder, D.

(2009). Comparative analysis of ESCRT-I, ESCRT-II and ESCRT-III function in *Drosophila* by efficient isolation of ESCRT mutants. *J. Cell Sci.* *122*, 2413–2423.

Vale, R.D., Spudich, J.A., and Griffis, E.R. (2009). Dynamics of myosin, microtubules, and Kinesin-6 at the cortex during cytokinesis in *Drosophila* S2 cells. *J. Cell Biol.* *186*, 727–738.

Watanabe, N., Kato, T., Fujita, A., Ishizaki, T., and Narumiya, S. (1999). Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat. Cell Biol.* *1*, 136–143.

Welburn, J.P.I., Tucker, J.A., Johnson, T., Lindert, L., Morgan, M., Willis, A., Noble, M.E.M., and Endicott, J.A. (2007). How tyrosine 15 phosphorylation inhibits the activity of cyclin-dependent kinase 2-cyclin A. *J. Biol. Chem.* *282*, 3173–3181.

White, J.G., and Rao, G.H. (1983). Influence of a microtubule stabilizing agent on platelet structural physiology. *Am. J. Pathol.* *112*, 207–217.

Wollert, T., Yang, D., Ren, X., Lee, H.H., Im, Y.J., and Hurley, J.H. (2009). The ESCRT machinery at a glance. *J. Cell Sci.* *122*, 2163–2166.

Yang, J., and Reth, M. (2012). *Drosophila* S2 Schneider cells: a useful tool for rebuilding and redesigning approaches in synthetic biology. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *813*, 331–341.

Yuan, K., and O’Farrell, P.H. (2015). Cyclin B3 is a mitotic cyclin that promotes the metaphase-anaphase transition. *Curr. Biol. CB* *25*, 811–816.

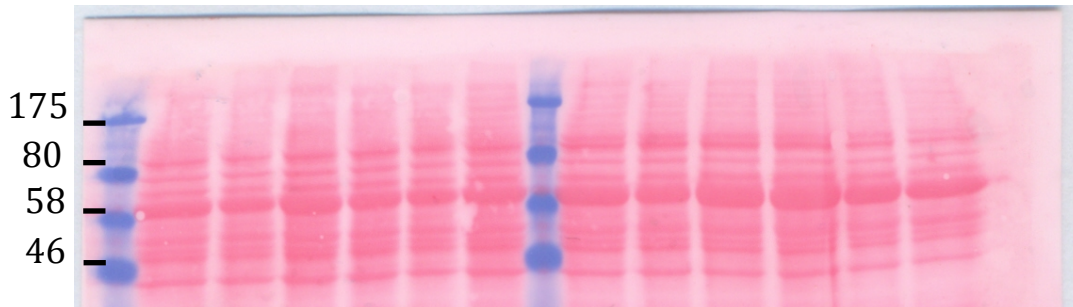
Zavortink, M., Contreras, N., Addy, T., Bejsovec, A., and Saint, R. (2005). Tum/RacGAP50C provides a critical link between anaphase microtubules and the assembly of the contractile ring in *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Sci.* *118*, 5381–5392.

Zemel, A., and Mogilner, A. (2009). Motor-induced sliding of microtubule and actin bundles. *Phys. Chem. Chem. Phys. PCCP* *11*, 4821–4833.

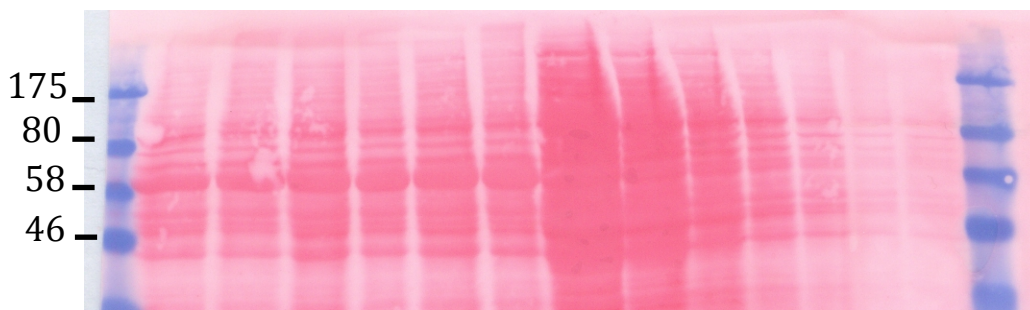
Annexes

Annexe 1 : Le rouge ponceau de l'expérience de l'Immunobuvardages. La quantité de protéines est intense et constante entre les conditions. La dilution en série est très nette.

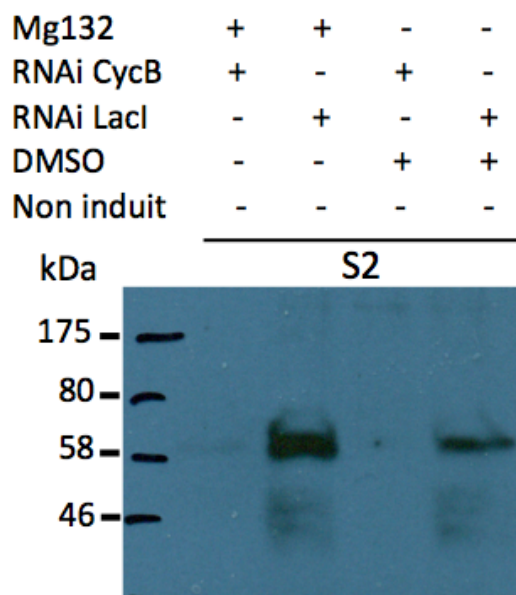
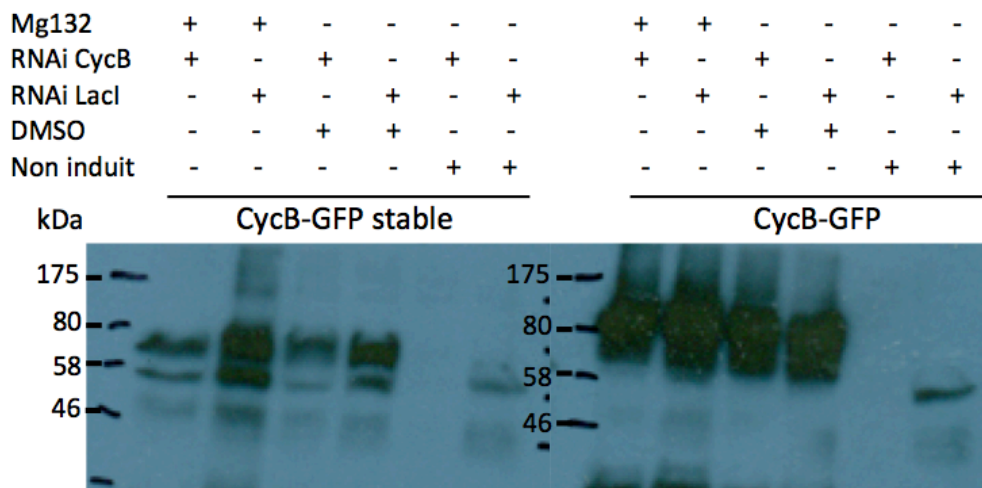
RNAi LacI	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
RNAi CycB	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
kDa	S2						CycB-GFP stable					
	3j		2j		1j		3j		2j		1j	



RNAi LacI	+	-	+	-	+	-	S2 dilution en série						
RNAi CycB	-	+	-	+	-	+							
kDa	CycB-GFP												
	3j		2j		1j		100%	50	25	12,5	6,5	3,1	1,5



Annexe 2 : Expression de la CycB endogène en souches non transfectées, transfectées avec CycB^{stable}-GFP et CycB-GFP. Sur la Cycline B stable on observe une expression nette au bout de 3 jours.



MD	pMT Shrub-GFP, Anillin-mCh
MD	pMT VPS4-GFP, Anillin-mCh

Tableau 6 : Souches transfectées pour futures expériences

Shrb_dsRNA_3UTR_L	gggcgggtGTCCAATAATCAGAGAG
Shrb_dsRNA_3UTR_R	gggcgggtGCGCCTCTCGCGGCTACTGA
VPS4_dsRNA_3UTR_L	gggcgggtGAGGGCTAGACACGAACC
VPS4_dsRNA_3UTR_R	gggcgggtGTTAAATAGGTTTGCTCGACTGCG

Tableau 7 : ARNdb produit en laboratoire pour de futures expériences