



THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS SUD

Ecole Doctorale Gènes Génomes Cellules

Présentée par

Mlle Neuza Reis MATIAS

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITE PARIS SUD

Régulation de l'abscission dans la lignée germinale femelle de drosophile

dirigée par Dr Jean-René HUYNH

à l'Institut Curie, U934/UMR3215, 26 rue d'Ulm, 75005, Paris, France

soutenue le 22 Septembre 2015, devant le jury composé de:

Pr Laurent THÉODORE.....Président

Dr Barry THOMPSON.....Rapporteur

Dr Arnaud ECHARD.....Rapporteur

Dr Stéphane RONSSERAY.....Examineur

Dr Roland LE BORGNE.....Examineur

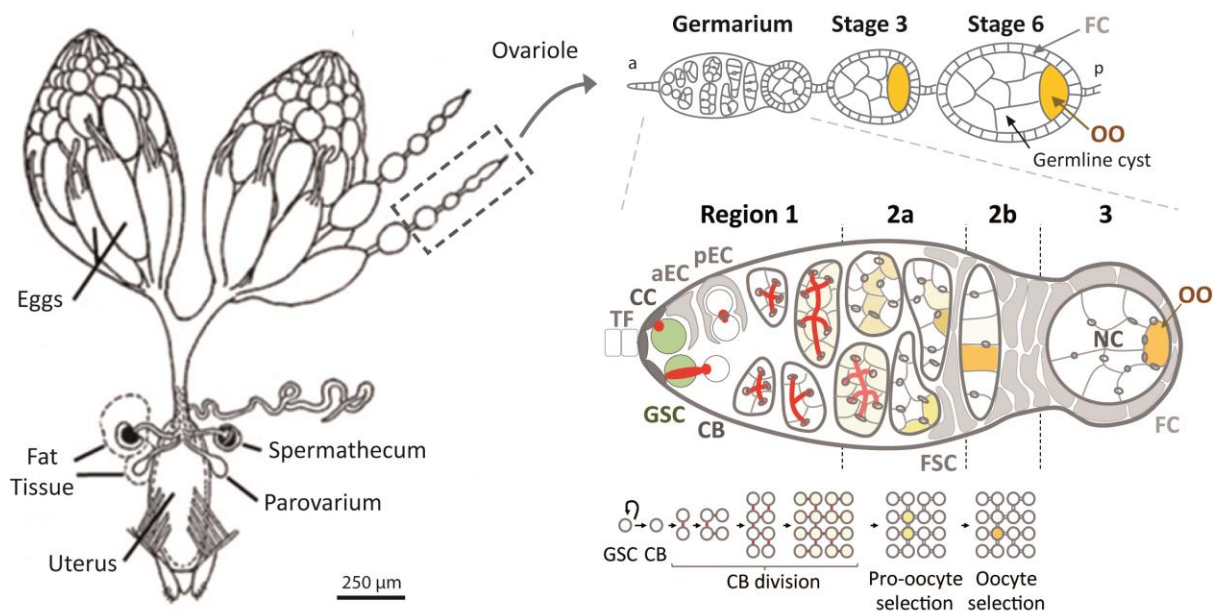
Dr Jean-René HUYNH.....Directeur de thèse

Dr Juliette MATHIEU.....Co-directeur de thèse

1. Introduction générale

Les gamètes matures sont des cellules haploïdes qui résultent de la différenciation d'une petite population de cellules germinales diploïdes spécifiées au cours de l'embryogenèse. Cette différenciation comprend la méiose, permettant de passer de cellules diploïdes à haploïdes, mais aussi plus précocement une étape d'amplification des cellules diploïdes. Cette étape d'amplification passe dans de nombreuses espèces par la formation de cystes germinaux. Un cyste est un groupe de 2^n cellules reliées entre elles par des ponts cytoplasmiques, issus de n divisions synchrones et à cystocinèse incomplète d'un précurseur unique appelé cystoblaste. Le nombre n de mitoses varie en fonction des espèces, de 4 chez le xénope, à 8 chez certains diptères. Les mécanismes moléculaires qui régulent ce nombre n sont encore inconnus (Huynh and St Johnston, 2004; Pepling et al., 1999). Un des projets du laboratoire de Jean René Huynh consiste à mieux comprendre la formation de ces cystes germinaux, dans le modèle bien décrit de la drosophile.

L'ovaire de drosophile adulte est aujourd'hui le système biologique le mieux caractérisé en regard de la formation de tels cysts. L'ovogenèse précoce de la drosophile a lieu dans la région la plus antérieure de l'ovaire, appelée le germarium. Chaque germarium compte dans sa région antérieure deux à trois cellules souches germinales, en contact et régulées par le micro-environnement des cellules somatiques de la niche. En se divisant de façon asymétrique, les cellules souches se renouvellent et produisent un cystoblaste. Ce cystoblaste se divise ensuite 4 fois de façon synchrone et incomplète formant un cyste de seize cellules, reliées entre elles par des canaux en anneau. Chez la drosophile, bien que toutes les cellules du cyste entrent en méiose, une seule devient ovocyte ; les 15 autres adoptent le destin de cellules nourricières.

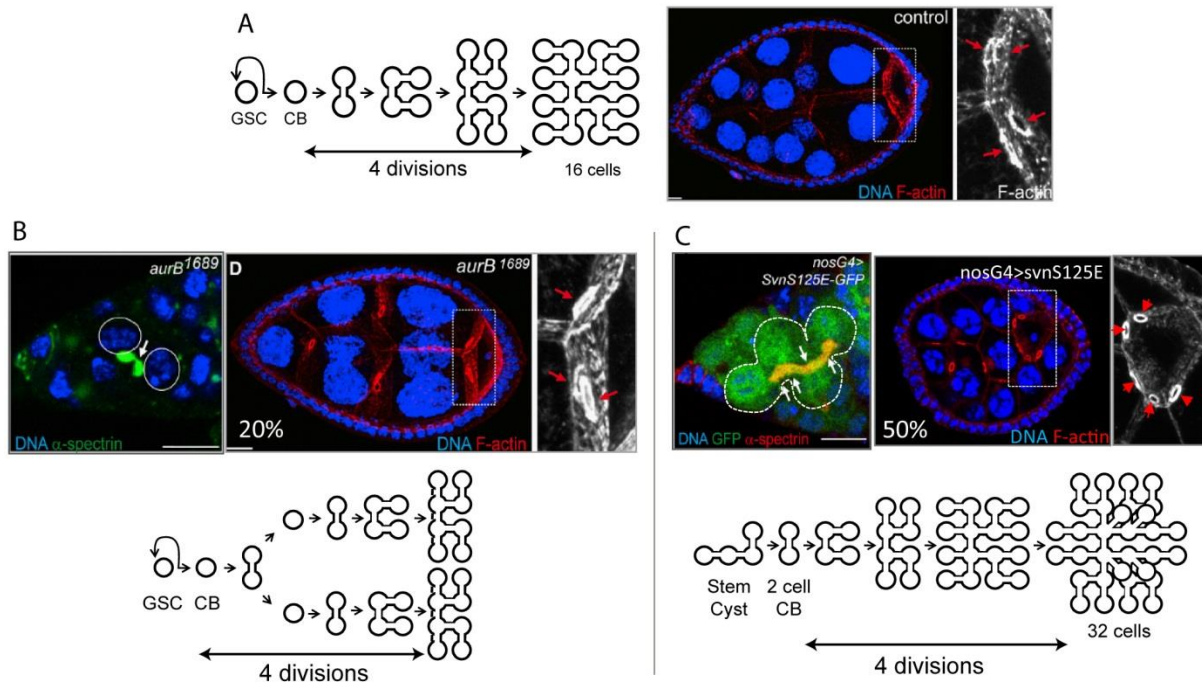


Les mécanismes qui gouvernent les mitoses particulières du cyste germinale, leur nombre, leur synchronie, et le fait que la cytokinèse soit incomplète sont mal connus. Cependant, le fusome, un organelle conservé chez le xénope, qui relie les 16 cellules au travers des canaux en anneau est nécessaire à la synchronisation des mitoses dans le cyste, ainsi qu'à la détermination et la polarisation de l'ovocyte. Le peu de gènes aujourd'hui été impliqués dans la régulation du nombre de cellules du cyste sont des régulateurs du cycle cellulaire (cycline E, encore, *cdc25/string*, *tribbles*) dont le mode d'action reste inconnu (Huynh and St Johnston, 2004).

2. Contexte

A mon arrivée au laboratoire, l'équipe de Jean-René Huynh mettait en évidence le rôle essentiel de deux kinases, Aurora B et Cdk1/Cycline B, dans la régulation du nombre de cellules des cystes germinaux. En effet, un gain de fonction de l'activité d'Aurora B induit la formation de chambres ovariennes à 32 cellules (ou plus), tandis qu'une activité réduite d'Aurora B induit la formation de chambres à 8 cellules. De façon opposée, la perte partielle de l'activité de la kinase Cdk1/ Cycline B induit la formation de chambres ovariennes à 32 cellules. Ces deux kinases sont impliquées dans les étapes précoces de la mitose.

Cependant, les phénotypes 8 et 32 cellules observés par leurs gains ou pertes d'activité sont attribuables à des rôles plus tardifs de ces kinases, lors de l'abscission. L'abscission est l'étape finale de la division cellulaire, au cours de laquelle le pont cytoplasmique reliant les cytoplasmes des deux cellules filles est rompu. Les kinases Aurora B et Cdk1/ Cycline B agiraient de façon opposées lors de l'abscission : Aurora B serait capable de la retarder, tandis que Cdk1/ Cycline B de la promouvoir. Un délai d'abscission dans la cellule souche permet aux deux cellules filles issues de la division de rester connectées jusqu'au cycle suivant, ce qui génère la formation d'une structure particulière appelée stem-cyst observée dans la partie antérieure du germarium. Dans le stem-cyst, les cellules ont une identité de cellule souche (elles reçoivent les signaux de la niche, au moins la cellule la plus antérieure) mais sont connectées entre elles par des ponts cytoplasmiques, et reliées entre elles par un fusome branché, comme dans un cyste. Le modèle proposé au laboratoire est que ce stem-cyst finit par réaliser une abscission, en générant un cystoblaste non pas unicellulaire, mais bicellulaire. Lorsque ce progéniteur bicellulaire se différencie – ie fait 4 cycles mitotiques- il forme une chambre ovarienne de 32 cellules. A l'inverse, le phénotype 8 cellules observé dans la perte de fonction d'Aurora B serait lié à une abscission précoce du cyste de deux cellules.

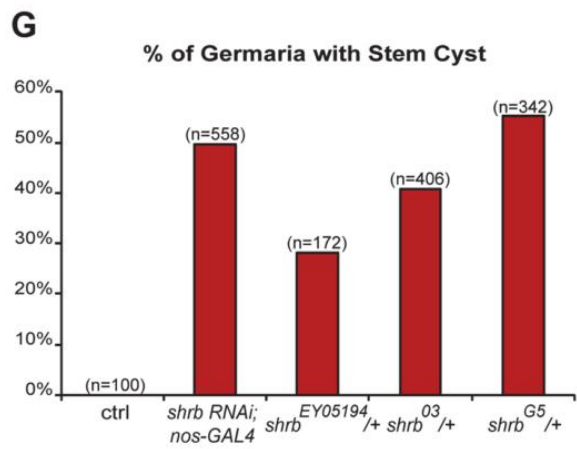
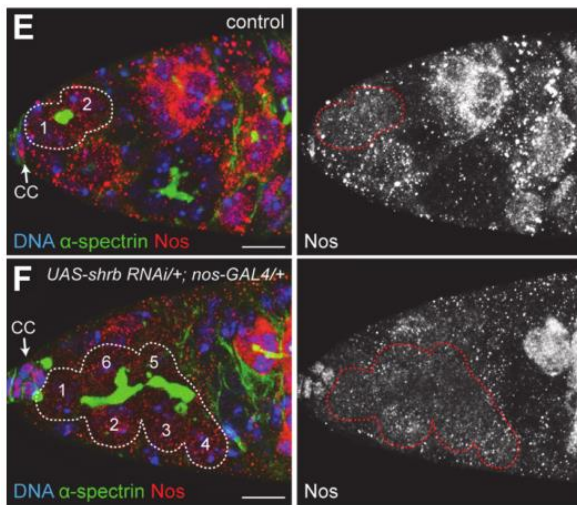
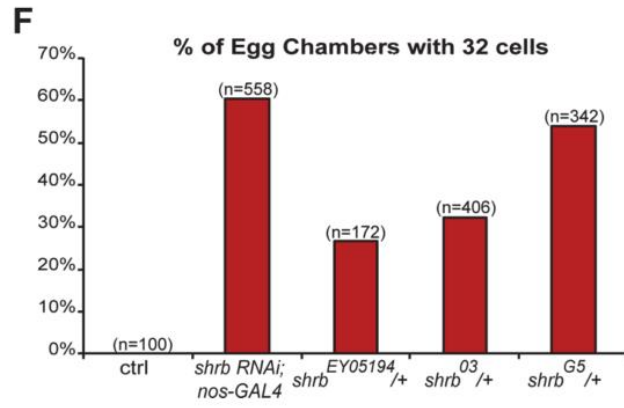
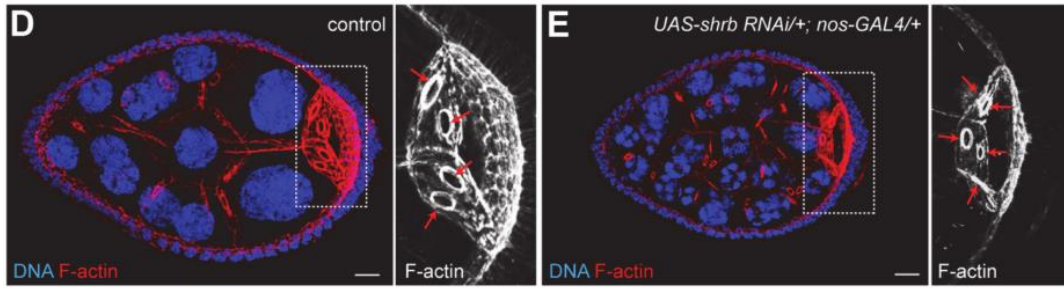


Suite à ce travail montrant l'implication des kinases Aurora B et Cdk1 lors de l'abscission, le but était d'identifier des acteurs moléculaires de l'abscission agissant en aval de ces kinases, capables de réaliser la scission membranaire, et potentiellement régulées par l'une ou l'autre de ces kinases. Mon travail de thèse a consisté en l'étude de la protéine Shrub au cours de l'abscission.

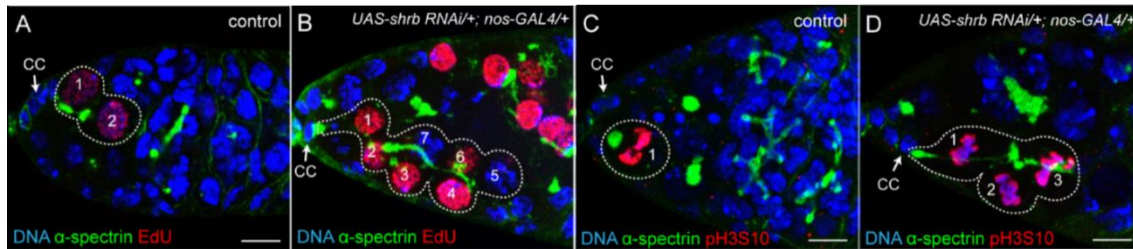
3. La protéine ESCRT-III Shrub régule l'abscission des cellules souches germinales de drosophile

Shrub est l'homologue de la protéine Snf7 de levure ou CHMP4 des vertébrés, système dans lequel CHMP4 est requis pour l'abscission (Agromayor and Martin-Serrano, 2013). Chez la drosophile, Shrub est connu pour son rôle dans la formation des Multi Vesicular Bodies (MVB), mais son implication lors de l'abscission n'a pas été mise en évidence (Vaccari et al., 2009).

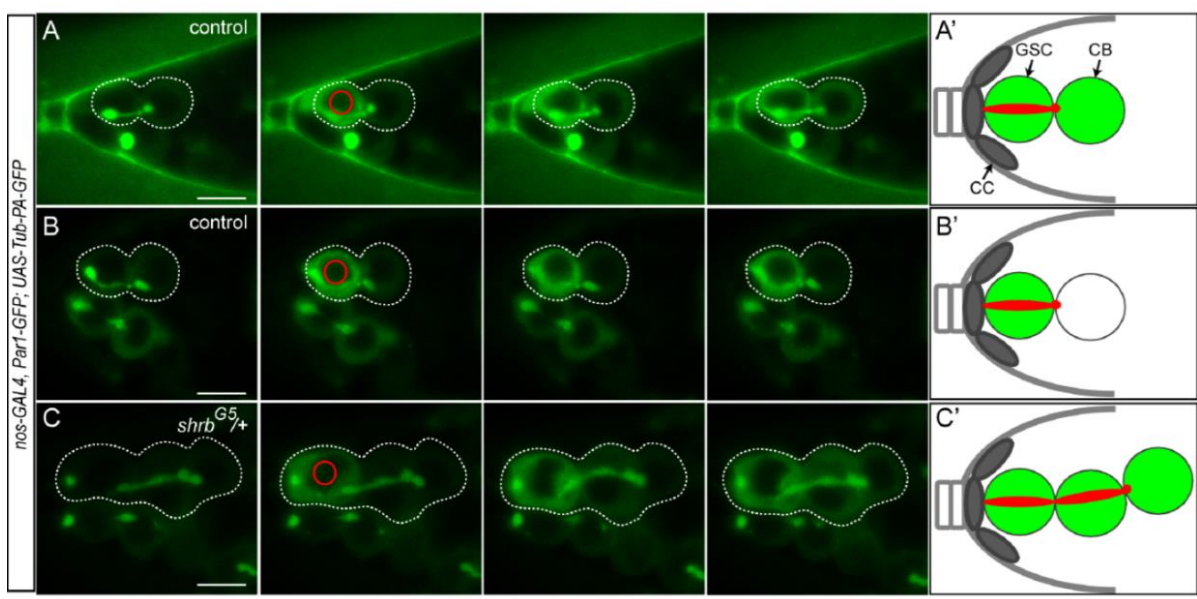
Nous avons dans un premier temps réalisé des expériences de perte de fonction de Shrub, en exprimant un RNAi dirigé contre *shrub* spécifiquement dans la lignée germinale. Nous avons observé la formation de chambres ovarienne à 32 cellules, et plus précocement, de stem-cysts dans le germarium. Ce phénotype est similaire à celui observé en cas de retard d'abscission induit par un gain de fonction d'Aurora B ou une perte de fonction de Cyclin B/Cdk1. Ce résultat suggère que Shrb est requis pour l'abscission des cellules souches germinales chez la drosophile. De plus, nous avons observé un phénotype similaire en contexte hétérozygote pour des mutations perte de fonction du gène *shrub*. Ce résultat confirme la spécificité du phénotype induit par le RNAi, et indique que le dosage du gène *shrub* est important pour une abscission efficace dans les cellules souches.



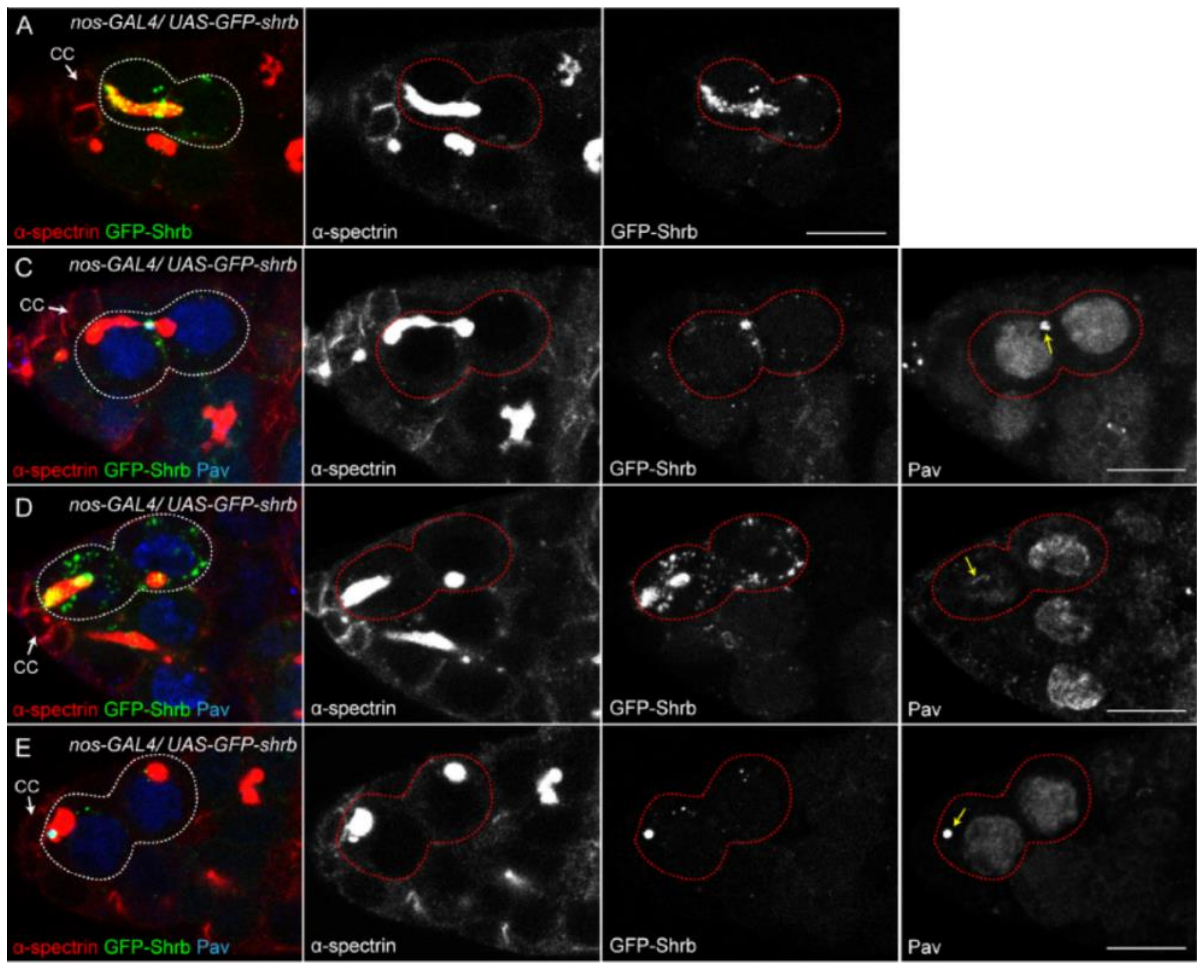
Nous avons ensuite caractérisé plus en détails les stem-cysts observés dans ces expériences de perte de fonction. Nous avons montré que les cellules des stem-cysts étaient synchrones en phase S et en phase M du cycle cellulaire.



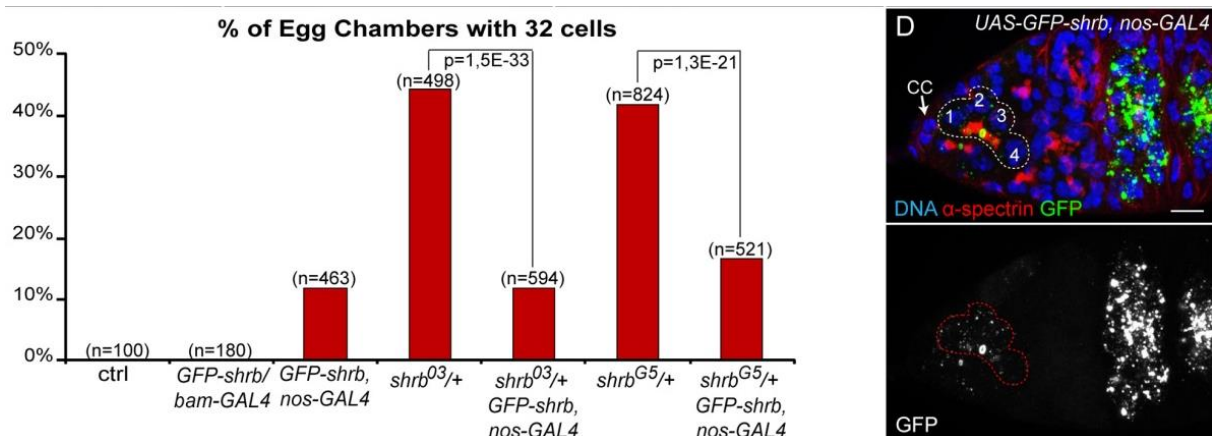
Nous avons de plus cherché à mettre en évidence le fait que les cellules du stem-cyst sont reliées entre elles et qu'elles partagent le même cytoplasme. Pour cela, nous avons exprimé dans l'ensemble de la lignée germinale une tubuline fusionnée à une GFP photo-activable par excitation laser. Ainsi, en absence de photo-activation, cette tubuline-GFP n'est pas fluorescente ; elle le devient uniquement localement sous l'effet du laser. Dans des femelles sauvages, dans lesquelles la Tubulin-GFP photoactivable n'est activée que dans la cellule souche, on observe une diffusion de la GFP uniquement dans le cystoblast voisin, ou pas de diffusion. En combinant cette expérience à un marqueur du fusome, qui permet d'apprécier le stade du cycle cellulaire, nous avons montré que l'abscission des cellules souches sauvages a lieu en fin du cycle G2 suivant. Ces résultats sont en accord avec des données publiées précédemment par l'équipe d'A. Spradling et nous-mêmes montrant que les cellules souches et le cystoblaste présentent une synchronie de la phase S (de Cuevas and Spradling, 1998 ; Mathieu et al., 2013). La même expérience réalisée dans les stem-cysts de femelles hétérozygotes pour *shrub* permet d'observer une diffusion de la GFP non seulement dans la cellule voisine de la cellule souche, mais aussi plus tard dans une cellule plus éloignée. Ce résultat nous permet de conclure que la tubuline-GFP diffuse d'un cytoplasme à l'autre au sein des stem-cysts.



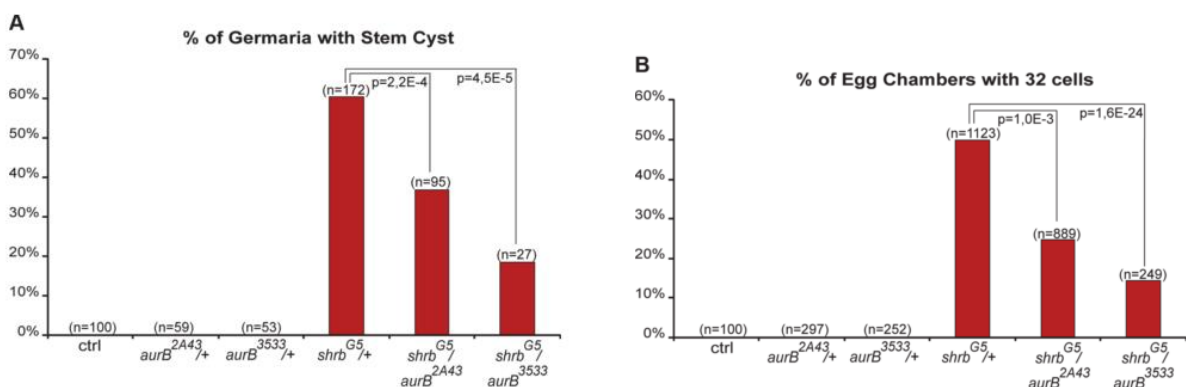
Pour mieux comprendre la fonction de Shrb durant l'abscission des cellules souches germinales, nous avons généré et exprimé dans la lignée germinale une protéine de fusion GFP-Shrub. Cet outil nous a permis de montrer que GFP-Shrub est localisé sur des vésicules associées au fusome avant l'abscission, ainsi qu'au niveau du canal en anneau qui relie la cellule souche et le cystoblaste. Plus tardivement, au moment présumé de l'abscission (déterminé par la forme du fusome en point d'exclamation), GFP-Shrub est accumulé au niveau du midbody, où il co-localise avec la protéine Pavarotti. Enfin, après l'abscission, GFP-Shrub continu à être localisé au midbody avec Pavarotti, et nous l'observons sur le fusome qui se rétracte vers le pôle antérieur de la cellule souche, ou au niveau du spectrosome plus tardivement. Ces résultats montrent que GFP-Shrub est localisé à l'endroit de la scission membranaire, et suggèrent donc que la protéine Shrub endogène est bien impliquée dans cette fonction. De plus, nos résultats sont en accord avec des données récemment publiées qui montrent que le midbody est hérité par la cellule souche après l'abscission (Salzmann et al., 2014). Nous ajoutons qu'il est emporté par le fusome au cours de sa rétraction antérieure.



Par ailleurs, nous avons observé au cours de ces expériences que la surrexpression de GFP-Shrub est suffisante pour générer des stem-cysts, et des chambres ovariennes constituées de 32 cellules. Ce résultat pourrait indiquer que GFP-Shrub agit de façon dominante négative. Pour tester cette hypothèse, nous avons exprimé GFP-Shrub dans des femelles hétérozygotes pour le gène *shrub*. La quantification des chambres à 32 cellules indique clairement que GFP-Shrub est capable de sauver la perte de fonction du gène *shrub*, et permet donc d'exclure le fait que GFP-Shrub agit en dominant négatif. De façon complémentaire à nos analyses de perte de fonction, nous concluons que le dosage de Shrub est critique pour l'abscission.

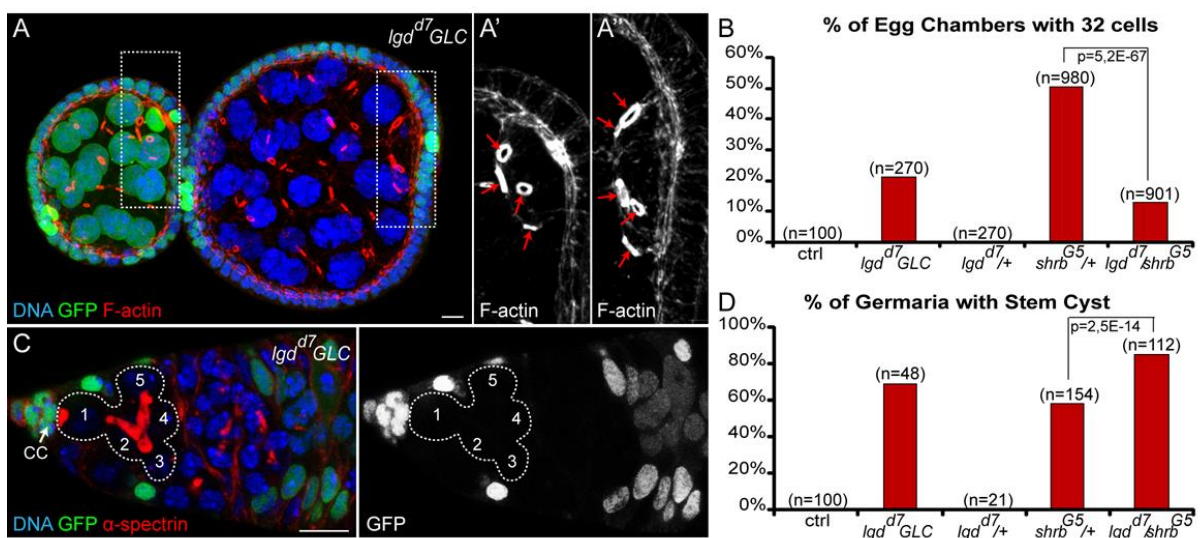


Chez les vertébrés, CHMP4 existe en plusieurs isoformes, issues de l'épissage alternatif du transcrit. Les formes CHMP4B et CHMP4C sont toutes deux impliquées dans l'abscission. CHMP4B est strictement requis pour l'abscission, tandis que CHMP4C a un effet inhibiteur sur l'abscission. Cet effet inhibiteur est dû à sa phosphorylation par la kinase Aurora B (Carlton et al., 2012) (Capalbo et al., 2012). Nous avons donc cherché à déterminer Shrb et Aurora B interagissent génétiquement chez la drosophile. Nous avons montré que l'hétérozygotie d'*aurora B* est capable de réduire la pénétrance du phénotype 32-cellules et le nombre de stem-cysts observés en contexte hétérozygote pour *shrub*. Ce résultat indique des effets opposés d'Aurora B et Shrub sur l'abscission, et suggère qu'Aurora B pourrait réguler Shrub négativement.



Un régulateur connu de Shrub chez la drosophile est la protéine Lethal giant discs (Lgd), qui est requise pour l'activité de Shrub pendant la formation des MVB (Troost et al., 2012). Nous avons donc testé l'implication de Lgd lors de l'abscission des cellules souches de drosophile. Nous avons réalisé des clones germinaux mutants pour Lgd par la technique de Flp/FRT, et avons observé que les chambres ovariennes mutantes étaient formées de 32 cellules dans 20% des cas. Par ailleurs, les cellules souches mutantes forment des stem-cysts dans 70% des cas. Ces résultats indiquent clairement que Lgd est requis pour l'abscission des cellules souches. Nous avons aussi testé l'interaction génétique entre Lgd et Shrub. En accord avec un rôle positif de Lgd sur Shrub, nous avons montré que la perte d'une copie de Lgd augmente le nombre de stem-cysts formés dans les femelles *shrb^{G5}/+*.

De façon plus surprenante, la perte d'une copie du gène *lgd* réduit le nombre de chambres à 32 cellules présentes dans les femelles *shrb^{G5}/+*. Ce résultat suggère que Lgd agit négativement sur Shrb à un stade postérieur à l'abscission des cellules souches. Nous avons émis l'hypothèse que Lgd est requis au maintien de l'abscission incomplète dans les cystes mitotiques. Cette proposition permettrait aussi d'expliquer pourquoi le nombre de chambre à 32 cellules n'est pas corrélé au nombre de stem-cysts observés dans les clones mutants *lgd*. Nous ne pouvons pas tester cette hypothèse car il n'est pas possible actuellement de générer une perte de fonction de Lgd uniquement dans les cystes mitotiques.

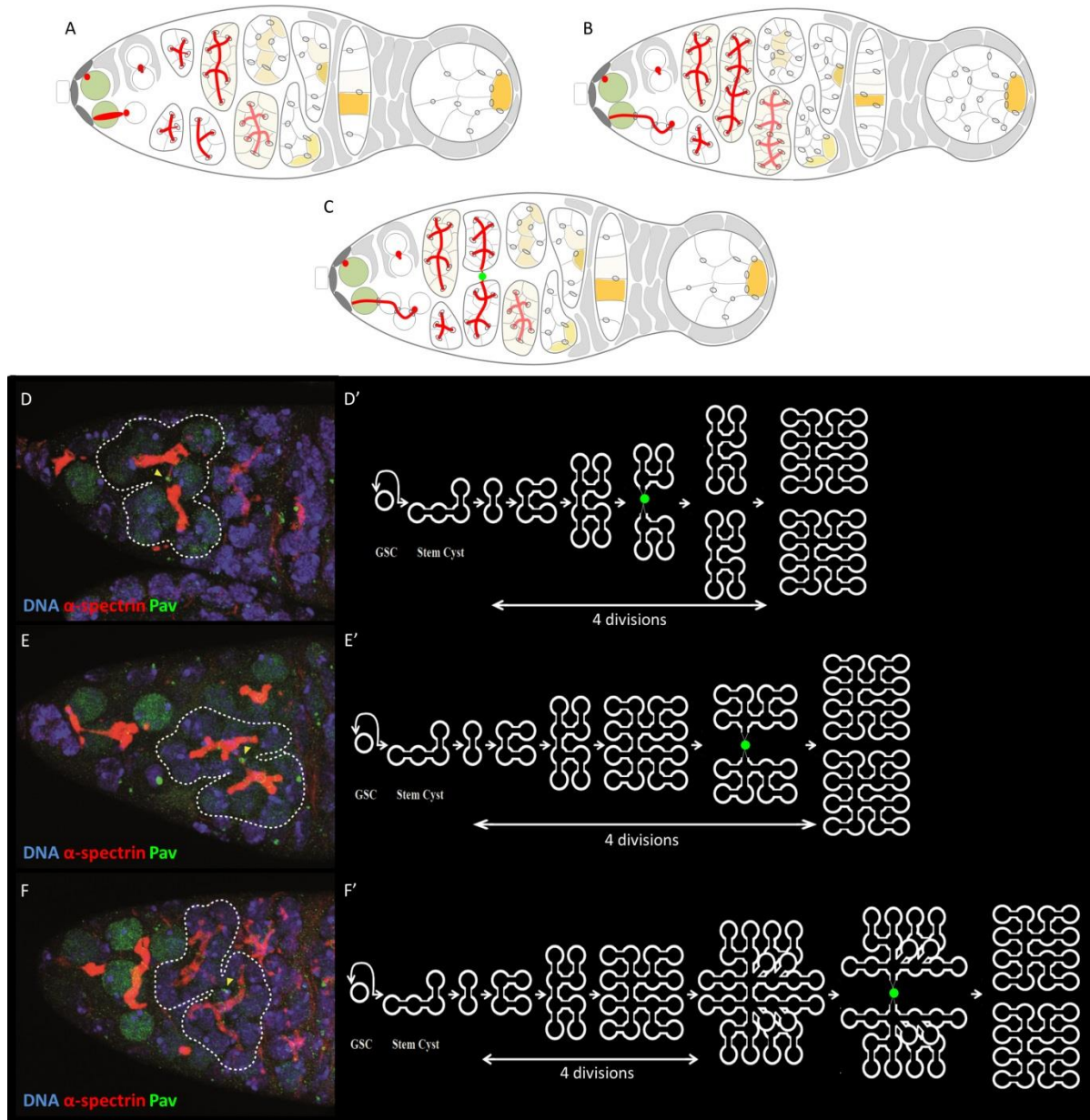


L'ensemble de ces résultats est présenté dans un article publié en février 2015 par la revue Plos Genetics (Matias, et al, 2015). Ils montrent pour la première fois une fonction de Shrub in vivo lors de l'abscission, et identifie la protéine Lgd comme un facteur crucial de l'abscission dans la lignée germinale.

4. Travail en cours

Mes résultats indiquent que la protéine Lgd joue un rôle complexe lors de l'abscission puisque Lgd apparait comme régulateur positif de l'abscission des cellules souches, et négatif dans le cyste. Je cherche actuellement à mieux comprendre ses fonctions opposées dans des compartiments adjacents.

Un aspect crucial consiste d'abord à confirmer que Lgd joue un rôle négatif sur l'abscission dans le cyste. En effet, nous avons conclu cela par l'observation des doubles hétérozygotes *shrb, lgd/+*, dans lesquels on observe plus de stem-cysts que dans *shrb/+*, mais bien moins de chambres à 32 cellules. Nous avons donc proposé que les stem-cysts formés dans *shrb, lgd/+* génèrent bien des cystes à 32 cellules, mais qu'une abscission complète finissait par se produire au sein de ces cystes, sauvant apparemment ce phénotype 32 cellules. J'ai pu vérifier cette hypothèse par immuno-marquage : les cystes formés chez *shrb, lgd/+* réalisent effectivement une abscission tardive dans la région mitotique.

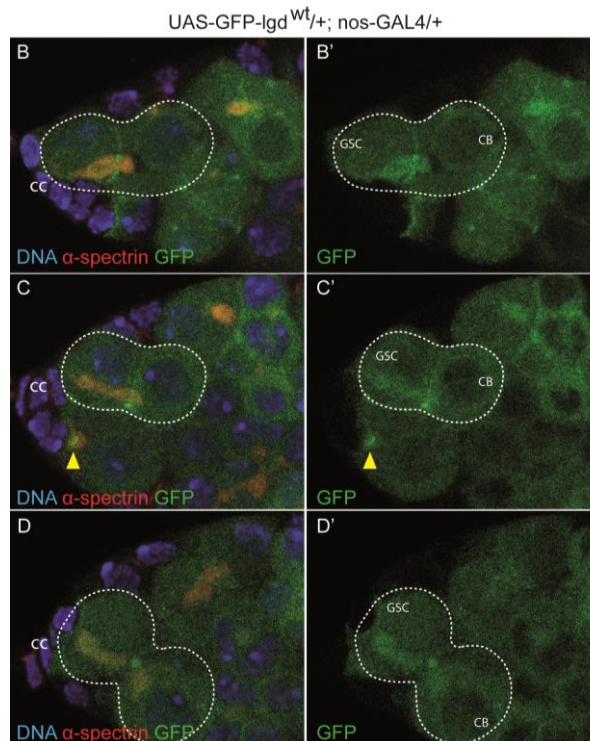


Cependant , il faut maintenant tester si Lgd inhibe l'abscission dans les cystes en général, ou uniquement en contexte *shrb/+* . Autrement dit, Lgd est il requis pour bloquer l'abscission des cystes si ceux-ci ne sont pas issus d'un stem-cyst ?

Pour répondre à cette question, je suis en train de générer des mouches transgéniques porteuses d'un transgène UAS-RNAi Lgd. Ce transgène sera exprimé dans la région mitotique grâce au driver Bam-Gal4.

Le driver Bam-Gal4 n'est pas très fort, et il est possible que la réduction de Lgd soit trop modeste pour observer un phénotype dans le cyste. C'est pourquoi je développe aussi une méthode alternative pour réaliser une perte de fonction spécifiquement dans le cyste. Il s'agit de tagger par la GFP la protéine Lgd endogène (par la technologie CRISPR), et de la dégrader spécifiquement dans le cyste grâce à l'expression dans le cyste d'un nanobody reconnaissant la GFP (donc GFP-Lgd) et fusionné à un domaine Ubiquitine-ligase (adressant ainsi la GFP vers le protéasome). Les lignées transgéniques sont en cours de construction.

Un second aspect consiste à déterminer comment Lgd est régulé par la kinase Cdk1. En effet, Lgd possède 14 sites consensus pour cette kinase, la position de 8 d'entre eux étant conservée dans la protéine humaine. J'ai donc généré des constructions UAS-Lgd dans lesquels les 14 sites sont mutés pour mimer des formes non phosphorylables ou phospho-mimétiques. L'analyse préliminaire montre que ces trois variants localisent au point d'abscission. Ce résultat valide l'implication de Lgd lors de l'abscission. Le phénotype de ces variants sera analysé en contexte mutant pour Lgd, et permettra de déterminer si Lgd est une cible de la kinase Cdk1 au cours de l'abscission.



5. Autres projets

En parallèle de mon projet sur l'abscission, j'ai exploré de nouvelles fonctions putatives de la kinase Aurora B. J'ai découvert qu'Aurora B, outre sa fonction mitotique, pouvait réguler l'expression génique en cellules interphasique par sa capacité à remodeler la chromatine. En effet, j'ai montré que la perte d'une copie d'Aurora B affecte la formation de l'hétéro-chromatine en utilisant un élément transposable porteur d'un gène mini-white soumis à variégation (Ronsseray et al, 2001). De plus, les niveaux d'Aurora B ont un impact sur le niveau transcriptionnel du récepteur à l'ecdysone, et régulent ainsi la migration des cellules de bordure. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour le laboratoire.