HAL
open science

Caractérisation du rôle de la signalisation Eph-éphrine dans la division cellulaire

Thomas Jungas

To cite this version:

Thomas Jungas. Caractérisation du rôle de la signalisation Eph-éphrine dans la division cellulaire. Interactions cellulaires [q-bio.CB]. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2015. Français. NNT : 2015TOU30102 . tel-01373976

HAL Id: tel-01373976

https://theses.hal.science/tel-01373976

Submitted on 29 Sep 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :
Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité :

Biologie du Développement

Présentée et soutenue par :
JUNGAS Thomas

le : 1er Juillet 2015

Titre :

Caractérisation du rôle de la signalisation Eph-éphrine dans la division cellulaire

---

Ecole doctorale :
Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)

Unité de recherche :
Centre de Biologie du Développement-UMR5547

Directeur(s) de Thèse :

Dr DAVY Alice

Rapporteurs :
Dr ECHARD Arnaud, Institut Pasteur, Paris
Dr GIET Régis, IGDR, Rennes
Dr ROCHE Serge, CRBM, Montpellier

Membre(s) du jury :

Pr HATZOGLOU Anastassia, IPBS, Toulouse

Remerciements

Tout d'abord je souhaite remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail : Le Dr. Hatzoglou Anastassia d'avoir accepté de présider ce jury, le Dr. Echard Arnaud, le Dr. Giet Régis et le Dr. Roche Serge, rapporteurs de ce jury. Leur intérêt pour mes travaux et leur présence dans ce jury m'honore.

Je souhaite remercier le Dr Davy Alice pour m'avoir accueilli dans son équipe il y a maintenant 8 ans et m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce doctorat. Ta confiance, l'autonomie que tu m'accordes et ton soutien sont pour moi indispensables et sources de motivation. Merci de me permettre d'exprimer ma curiosité au sein de tes projets scientifiques.

Un grand merci également à toute l'équipe actuelle Christophe, Julien et Anthony. J'apprécie votre enthousiasme feint pour la culture automobile biaisée que je défends. Merci aux anciens membres et notamment Annie et Maëva.
Merci Maëva de m'avoir murmuré l'idée que je pouvais aussi le faire. J'ai pris plaisir à être ton « Tech » quand ce fut ton tour. J'espère un jour mener un projet Crystal avec toi, surtout maintenant que tu es formée à la méthode américaine.

Merci au Dr. Besson Arnaud pour ses nombreux conseils, le partage de ces outils et nos échanges scientifiques riches d'enseignements pour moi.

Merci Pépito pour les litres de café partagés.

Merci Jean-Louis pour ton tutorat.

Merci à tous mes collègues du CBD.

Mention particulière à mes collègues d'étage avec qui j'ai plaisir à partager mes journées. Nos réunions mutuelles m'ont permis d'élargir ma vision scientifique. Fred, j'attends toujours les bons numéros.

Merci corporatiste à mes collègues ITAs, piliers de cette unité. Votre travail quotidien est bien sûr dans ce mémoire.

Je remercie la Délégation Midi-Pyrénées du CNRS pour son soutien financier.

Sur un plan personnel, je remercie ma famille. Vous êtes mon bonheur Premier.
Ce travail vous est dédié.
Merci Maman, Papa, Karine, Eric, Annie, Bébert, Hervé, Carole, et dans l'ordre d'apparition Hugo, Benjamin, Nathan, Baptiste et Thimotée. Merci à Biscotte pour la ronron-thérapie. Loustic.

Géraldine je te remercie au-delà des mots. Je ne sais pas exprimer sur le papier ce que je te dois. Je l'ai fait pour nous, grâce à toi.

Résumé

Au sein d'un organisme les cellules se divisent et assurent la croissance, la différentiation et l'homéostasie des tissus. Des travaux récents proposent qu'elles communiquent activement entre voisines au sein des organes solides pour coordonner leur propre division et la préservation de l'intégrité tissulaire.

Nous proposons que la signalisation Eph-éphrine, acteur de la communication cellulaire locale, participe à cette coordination entre division cellulaire et cohésion du tissu.

Au cours de ma thèse, j'ai démontré dans plusieurs modèles cellulaires que la signalisation Eph-éphrine contrôle la division cellulaire et peut induire des retards dans l'abscission et de la polyploïdie. J'ai prouvé par vidéomicrosocpie que ces défauts d'abscission dépendent du domaine catalytique du récepteur EphB2 et de l'activation de la protéine tyrosine kinase relais c-Src. En cascade, c-Src phosphoryle un régulateur clé de la stabilité du pont intercellulaire, la protéine citron kinase (CitK). J'ai également observé que CitK était anormalement localisé durant la cytocinése en aval de la voie Eph. Par des essais kinase *in vitro*, j'ai exclu une phosphorylation directe de CitK par le récepteur Eph et identifié c-Src comme capable de phosphoryler directement CitK. J'ai identifié les résidus tyrosines de CitK phosphorylés par c-Src, mutés deux d'entre eux et à l'aide d'analyses de sauvetage phénotypique, démontré que ces résidus étaient nécessaires et suffisants pour induire des défauts d'abscission.
J'ai ensuite validé *in vivo* ce rôle original de la voie Eph-éphrine, dans le contexte du développement neuronal chez la souris. Plusieurs membres de la famille des Eph-éphrines sont exprimés dans les progéniteurs neuraux à l'origine des neurones corticaux et des auteurs ont montrés que CitK contrôle la cytocinèse de ces cellules. En utilisant un système Cre-lox, j'ai spécifiquement éteint la signalisation Eph dans ces progéniteurs et observé une modification de la ploïdie neuronale dans ces animaux. J'ai également observé dans les progéniteurs neuraux une co-localisation physiologique de résidus tyrosines phosphorylés et de la protéine CitK, qui adopte un enrichissement apical caractéristique. Ces résultats suggèrent notamment que la signalisation Eph-éphrine pourrait contrôler l'abscission des progéniteurs neuraux via la phosphorylation de CitK.

La cytocinèse est aujourd'hui décrite comme un processus cellulaire autonome orchestré par la machinerie intracellulaire. Les résultats obtenus durant mon doctorat suggèrent que la cytocinèse est également régulée par l'environnement local de la cellule comme j'en ai fait la démonstration avec la signalisation Eph-éphrine. D'autre part, mes travaux suggèrent que la phosphorylation de CitK sert d'interrupteur moléculaire durant la progression à travers la division cellulaire et le contrôle de la ploïdie des neurones.

Abstract

Cells within an organism successfully divide to ensure growth, differentiation and homeostasie. Recent work suggests that dividing cells actively communicate with neighbours thus spatially and temporally coordinating cell division while maintaining tissue cohesiveness.

We hypothesized that Eph-ephrin signalling, a local cell-cell signalling pathway, could participate in coordinating cell division within a tissue.

Using vertebrate and invertebrate cell culture models I showed that Eph-signalling controls cell division and induces delay in the abscission of nascent daughter cells as well as polyploidy. Using time-lapse imaging I proved that the Eph-mediated abscission failure depends on the catalytic activity of the receptor via the non receptor tyrosine kinase relay molecule c-Src. Downstream of Eph signalling c-Src phosphorylates the protein citron kinase (CitK) a well known regulator of intercellular bridge stability. I also observed that CitK was abnormally localized during cytokinesis when Eph signalling was active. Further, using in vitro kinase assays, I demonstrated that Eph does not directly phosphorylate CitK but that c-Src could do so. In addition, using Mass Spectrometry I mapped all tyrosine residues directly phosphorylated by c-Src. I mutated two of them located in the Rho binding domain of CitK and demonstrated that phosphorylation of those residues are necessary and sufficient to induce cytokinesis failure.
I validated *in vivo* this novel role of Eph-ephrin signalling in a physiological context in the developing mouse neocortex. Members of the Eph/ephrin family are expressed in neural progenitors that give rise to neurons of the cortex upon neurogenic division. Importantly, CitK has been shown by others to control cytokinesis of these progenitor cells. Using the Cre-lox system, I specifically turned off Eph forward signalling in neural progenitor cells and observed an alteration of neuronal ploidy in these mutant animals. Further, I also observed that CitK which adopts a particular apical localisation in neural progenitors physiologically co-localized with phosphorylated tyrosine residues. Altogether, these results suggest that Eph-ephrin signalling controls abscission of neural progenitors by promoting phosphorylation of CitK.

The textbook view of cytokinesis is that it is a cell autonomous event orchestrated by the intracellular machinery. Data obtained during my PhD suggest that cytokinesis is also regulated by local environment, here Eph/ephrin signalling, and that phosphorylation of CitK may represent a molecular switch in the normal progression of cell division and in the control of neuronal ploidy.

Index des Tables et figures

Introduction

1. Division cellulaire : Grandes étapes du cycle cellulaire et cytocinèse 1

1.1. La division cellulaire 1
1.1.1. Pourquoi les cellules se divisent ? 1
1.1.2. Quelles cellules se divisent ? 2
1.1.3. Divisions symétriques et asymétriques 4

1.2. Le cycle cellulaire 6
1.2.1. L'enchainement des étapes du cycle cellulaire 6
1.2.2. La mitose 7
1.2.3. Les points de contrôle du cycle cellulaire 8
1.2.4. Le « Spindle Assembly Checkpoint » (SAC) 10
1.2.5. AuroraB et le Chromosomal Passenger Complex (CPC) 10

1.3. La cytocinèse 11
1.3.1. Définition et introduction sur la cytocinèse 11
1.3.2. L'assemblage du fuseau central 12
1.3.3. La spécification du plan de clivage 13
1.3.4. L'assemblage et la contraction de l'anneau de clivage 14

1.4. Le pont intercellulaire et le midbody 16
1.4.1. Les composants du pont 16
1.4.2. La protéine Citron kinase 22
1.4.3. La stabilité du pont 25

1.5. La coupure du pont : l'abscission 26
1.5.1. Les différents modèles d'abscission 27
1.5.2. La cytocinèse sans abscission 29
1.5.3. Aneuploïdie phathologique : les défauts d'abscission 31

1.6. Le Remnant 33
1.6.1. Quelle est sa composition ? 33
1.6.2. Diffusé ou directement hérité ? 33
1.6.3. Recyclage du remnant 34

2. La communication cellulaire et la signalisation Eph/éphrine 35

2.1 Notion de communication cellulaire 35

2.2 La famille des Eph/éphrine 36
2.2.1 Point de vue historique 36
2.2.2 Les récepteurs : les Ephs 37
2.2.3 Les ligands : les éphrines 37

2.3 La signalisation Eph/ephrine 38
2.3.1 Interaction ligand/récepteur 38
2.3.2 Signalisation bidirectionnelle 40
2.3.3 Cis-inhibition 41
2.3.4 Interactions avec d'autres récepteurs 42

2.4 Principales cascades moléculaires en aval de la signalisation Eph/ephrine 42
2.4.1 Signalisation Forward 42
2.4.2 Signalisation Reverse 43
2.4.3 Extinction de la signalisation 45

2.5 Rôles biologiques de la signalisation Eph/éphrine 46
2.5.1 Au cours du développement embryonnaire 46
2.5.2 Dans l'organisme adulte 49

3. Une notion récente : l'environnement influence la division cellulaire 54

3.1 Implication des jonctions cellulaires 54
3.1.2 Les jonctions serrées 55
3.1.3 Les jonctions communicantes 56
3.1.4 Les jonctions adhérentes 56

3.2 Implication des interactions avec la matrice 58

3.3 Implication des forces de contact 59

3.4 Implication des récepteurs à tyrosines kinases 60

Résultats

1. Manuscrit soumis : "Eph mediated tyrosine phosphorylation of citron kinase controls abscission and promotes neuronal polyploidy" 63

2. Effet à long terme du défaut de cytocinèse induit par la voie Eph forward : l'aneuploïdie ou l'apoptose 64

3. EphB2 est exprimé au niveau du midbody et la voie Eph :éphrine modifie la présence du MBR en partie apicale de la zone ventriculaire durant la neurogénèse 65

4. Le rôle de la voie Eph forward sur la cytocinèse est également observable chez les invertébrés 66

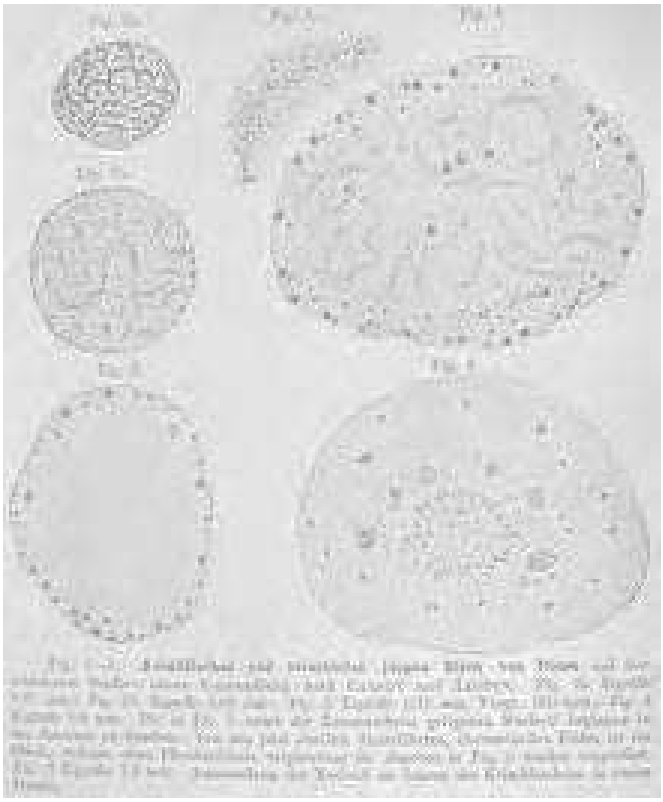
Discussion - Perspectives 69

Références Bibliographiques 76

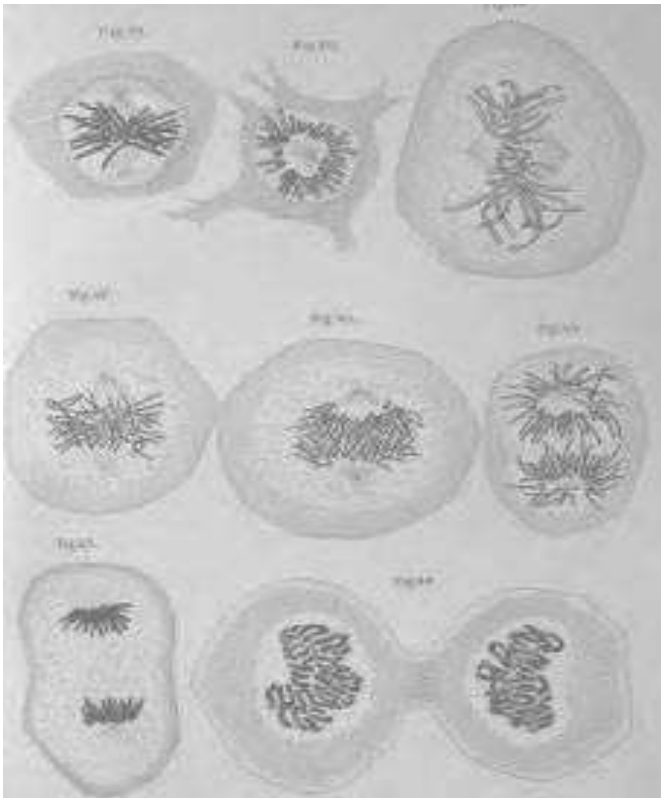
Index des Tables et Figures

Figure 1 : Méïose et mitose
Table 1 : Présentation synthétique des principales différences entre la méïose et la mitose
Figure 2 : Schématisation des divisions symétriques et asymétriques dans le neuroépithélium murin durant la neurogénèse
Figure 3 : Schématisation simplifiée de l'enchainement des différentes phases du cycle cellulaire
Figure 4 : Schématisation des phases de la mitose
Figure 5 : Les points de contrôle du cycle cellulaire
Figure 6 : La cytocinèse, grandes étapes
Figure 7 : La cytocinèse : L'assemblage du fuseau central
Figure 8 : La cytocinèse : la spécification du plan de clivage
Figure 9 : La cytocinèse : l'anneau contractile
Figure 10 : La cytocinèse : le pont intercellulaire
Figure 11 : La cytocinèse : le pont intercellulaire (2)
Figure 12 : Assemblage de la machinerie ESCRT
Figure 13 : Citron kinase (CitK)
Figure 14 : La stabilité du pont intercellulaire
Figure 15 : L'abscission
Figure 16 : La polyploïdie
Figure 17 : Le remnant
Figure 18 : La famille des Ephs-éphrines
Figure 19 : Interaction ligand-récepteur
Figure 20 : Signalisation bidirectionnelle
Figure 21 : Signalisation FORWARD
Figure 22 : Signalisation REVERSE
Figure 23 : Eph-éphrine dans le guidage axonal
Figure 24 : Expression des membres de la famille des Ephs-éphrines dans la neurogénèse
Figure 25 : Eph-éphrine dans la neurogénèse adulte
Figure 26 : Les jonctions cellulaires
Figure 27 : Réorganisation des jonctions serrées durant la mitose et la cytocinèse
Figure 28 : Modèle de division planaire des cellules épithéliales et des réarrangements des jonctions adhérentes

a



b



<u>Figure 1</u> : Méïose et mitose

a- Planche d'illustration de la **<u>Méïose</u>** d'œufs d'oursins, par Oscar Hertwig, 1870, extrait de *Lehrbuch der Entwicklungsgeschichte des Menschen und der Wirbeltiere*

b- Planche d'illustration de la condensation durant la **<u>Mitose</u>** par Walter Flemming, 1882, extrait de *Zellsubstanz, kern und Zelltheilung*

Introduction

1. Division cellulaire : Grandes étapes du cycle cellulaire et cytocinèse

Tous les organismes vivants se composent de cellules, d'une cellule unique pour les organismes unicellulaires jusqu'à plusieurs milliards chez les organismes pluricellulaires (10^{13} cellules chez l'homme) (Bianconi et al., 2013).
La division cellulaire est le mode de multiplication des cellules. Une cellule d'origine, communément appelée « cellule-mère » s'amplifie puis se scinde en deux cellules néo formées dites « cellules-filles ». La terminologie de « division » ne reflète d'ailleurs pas intégralement le processus de multiplication des cellules. En biologie, lorsqu'une cellule se divise, il n'y a pas de réduction de sa taille ou de sa composition puisqu'en fait elle se dé-double !

1.1. La division cellulaire

Il existe deux sous-types de divisions cellulaires que sont la méiose et la mitose.
La méiose est la division qui génère les cellules germinales (ou gamètes) lors de la reproduction sexuée.
La mitose est la division qui génère toutes les autres cellules. C'est aussi la méthode de division que j'ai décidé d'aborder au cours de mon doctorat et dont je parlerai la plupart du temps dans ce manuscrit.
La méiose a été décrite pour la première fois vers 1870 par Oscar Hertwig travaillant sur les œufs d'oursins puis comprise comme un mécanisme de réduction de la ploïdie vers 1890 par August Weismann (figure 1a)
La mitose a été découverte quasi simultanément par Walther Flemming grâce à son travail d'amélioration des colorations cellulaires qui lui a permis d'identifier notamment la chromatine et les chromosomes, préalable à sa description de la division cellulaire (figure 1b).
Les principales différences entre méiose et mitoses sont résumées dans la Table 1.

1.1.1. Pourquoi les cellules se divisent ?

	Méïose	Mitose
Définition	Division cellulaire aboutissant à 4 cellules filles ayant un nombre total de chromosomes réduit de moitié par séparation homologue	Division cellulaire engendrant 2 cellules filles avec un nombre total de chromosomes identique entre elles et identique à la cellule d'origine
Fonction	Diversité génétique à travers la reproduction sexuée	Renouvellement et amplification des cellules
Type de reproduction	sexuée	asexuée
Organismes concernés	Humains, animaux, plantes, champignons	Tous les organismes
génétiquement	Différent de la cellule d'origine	Identique à la cellule d'origine
Recombinaison homologue	Oui, possibilité	Non
Nombre de division	2 divisions successives	1 seule division
Appariement des chromosomes homologues	Oui	Non
Nombre de cellules filles produites	4 cellules haploïdes	2 cellules diploïdes
Nombre de chromosomes obtenus	Réduit de moitié	Identique
Etapes majeures	Prophase 1, Metaphase 1, Anaphase 1, Télophase 1, Prophase 2, Metaphase 2, Anaphase 2, Télophase 2	Prophase Metaphase Anaphase Télophase
Caryocinèse (séparation du matériel génétique)	Durant l'Interphase 1	Au cours de l'Interphase
Cytocinèse (séparation des cytosols)	Télophase 1 et Télophase 2	En Télophase
Division des centrosomes	Durant l'Anaphase 2 seulement	Durant l'Anaphase
Types cellulaires concernés	Cellules sexuelles durant la gamétogénèse : oocytes et spermatocytes	Toutes les cellules y compris cellules germinales primordiales
Identifiée par, année	Oscar Hertwig, 1870	Walther Flemming, 1878

Table 1 : Présentation synthétique des principales différences entre la méïose et la mitose.

La division cellulaire est indispensable à la survie de l'organisme. Elle permet dès la fertilisation et durant toute la phase embryonnaire, d'assurer la croissance de l'organisme, qui passe de 1 cellule à plusieurs dizaines de milliards. Elle permet aussi la spécification des cellules en organes et tissus qui assureront des fonctions différentielles dans l'organisme. C'est notamment le rôle de la division asymétrique, détaillée dans le chapitre suivant, de faire émerger des populations de cellules avec des fonctions spécialisées. Tout au long de la vie de l'organisme et à l'âge adulte, la division cellulaire permet également d'assurer le renouvellement tissulaire en remplaçant les cellules dont la durée de vie est limitée au sein d'un organe. Elle permet d'assurer l'homéostasie tissulaire et les variations cycliques de composition de certains tissus (remplacement quotidien des cellules de la peau desquamées, renouvellement des globules rouges, renouvellement des cellules épithéliales de l'intestin, épaississement menstruel de l'endomètre chez la femme pubère, …). Elle permet également en cas d'altération de tout ou partie de certains tissus d'éventuellement reconstituer et réparer cet organe. C'est le cas, par exemple, de la cicatrisation après une lésion cutanée. Elle permet en outre de pouvoir multiplier rapidement des cellules dont l'utilité n'est que transitoire dans l'organisme. Par exemple, la division des lymphocytes permet suite à la pénétration d'un agresseur dans l'organisme de mobiliser les défenses immunitaires de façon très rapides et très spécifiques en amplifiant des populations dédiées à l'élimination de cet agresseur.

Parfois aussi la division cellulaire peut jouer contre l'organisme. Son dérèglement peut conduire à la destruction de l'organisme. Les cancers ont souvent pour origine une altération de la division cellulaire. La division anarchique et incontrôlée de certaines cellules est responsable de l'amplification de la masse tumorale et de l'apparition de cellules dissèminantes, les cellules métastasiques, qui propagent la tumorisation dans tout l'organisme.

1.1.2. Quelles cellules se divisent ?

Si la plupart des cellules se divisent, il existe aussi des cellules qui ne se divisent pas. Parmi elles, on distingue deux catégories : les cellules dites quiescentes et les cellules post-mitotiques.

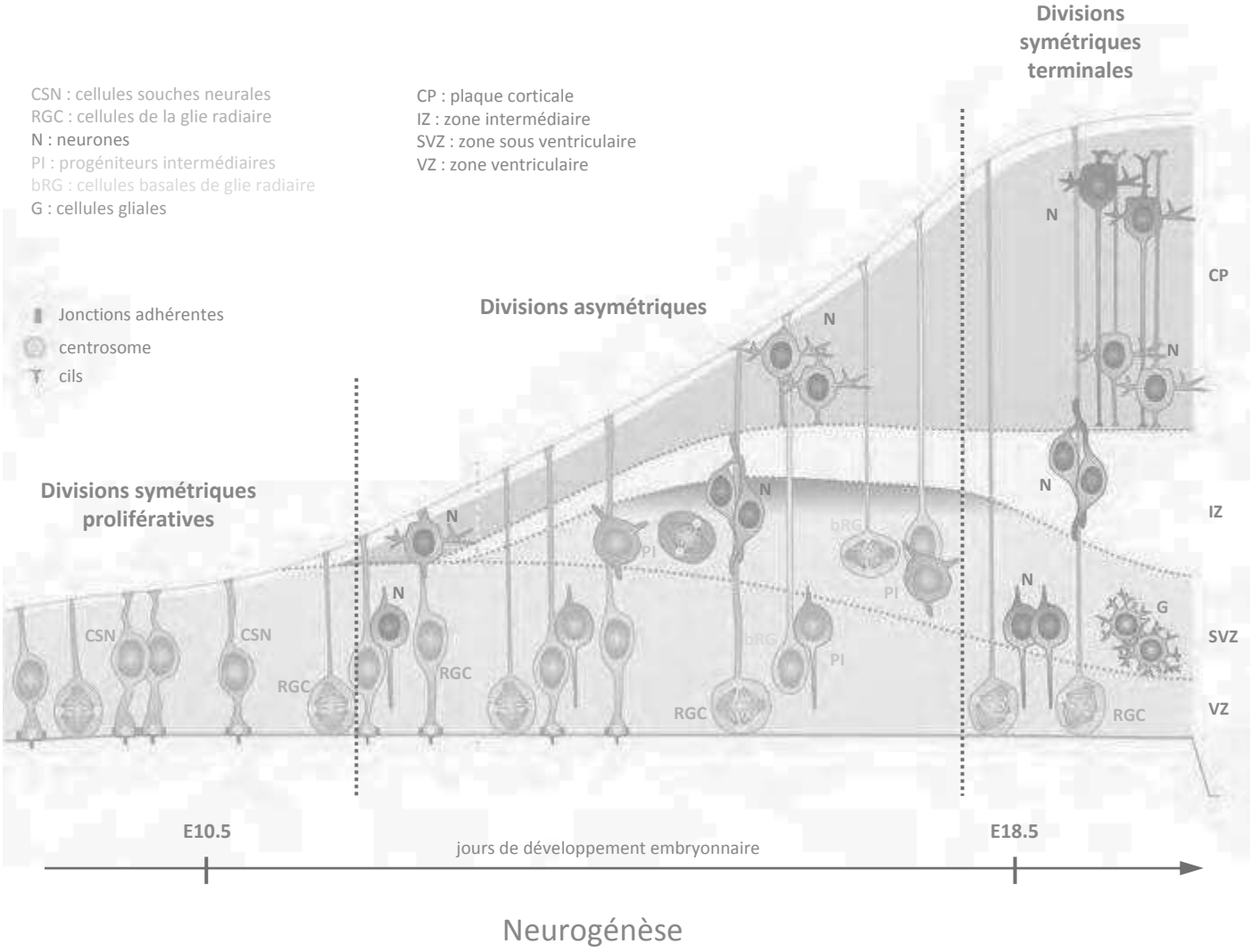
Les cellules quiescentes sont des cellules dans un état transitoire et réversible de blocage de leur prolifération. *In vivo* l'état de quiescence pourrait limiter la prolifération des cellules, et notamment celui des cellules souches, afin de conserver la fonction et l'homéostasie tissulaire. *In vitro* la quiescence cellulaire peut être induite dans diverses conditions comme la privation en facteur de croissance, l'inhibition de contact ou la perte d'adhésion. Cet état peut tout aussi facilement être levé en supprimant les conditions qui l'ont induit (Coller et al., 2006).

Les cellules post-mitotiques sont des cellules différenciées. Leur différentiation leur a permis d'acquérir des caractéristiques nouvelles généralement associées à des fonctions spécialisées et nécessaires au tissu qu'elles composent. Cette spécification des cellules va de pair avec une restriction des possibilités de différentiation. Ainsi la cellule œuf, juste après fertilisation, est totipotente car elle peut générer tous les types cellulaires qui composent l'organisme. A contrario, une cellule souche neurale par exemple, déjà engagée dans un processus de différentiation, sera uniquement pluripotente, ne pouvant générer que des cellules du lignage neural (neurones, cellules oligodendrocytaires, cellules de la microglie et les cellules astrocytaires). La différentiation d'une cellule est induite par des modulations de son programme génétique sans changement de la composition du génome de cette cellule. Les cellules post mitotiques ont longtemps été distinguées des cellules quiescentes par le caractère irréversible de l'état de différentiation et de leur incapacité à ré-entrer dans le cycle cellulaire. C'est d'ailleurs cette incapacité à se diviser de nouveau qui limiterai les possibilités de régénération tissulaire chez l'adulte (Srivastava and Ivey, 2006).
Ce concept irréversible et permanent de l'état post-mitotique est aujourd'hui remis en cause par quelques études. Par exemple, la division des neurones, cellules considérées en différentiation terminale, peut être induite *in vitro*, ces cellules possédant intacte toute la machinerie du cycle cellulaire fonctionnelle (van Oostende Triplet et al., 2014). Ce redémarrage du programme de division est généralement létal pour les cellules voir délétère pour le tissu, mais il reste possible. Les fibroblastes, les lymphocytes et les cardiomyocites sont également d'autres d'exemples de cellules post-mitotiques dont la démonstration *in vitro* et dans des conditions particulières a été faite de leur capacité à ré-entrer dans le cycle cellulaire (Szibor et al., 2014). L'état post-mitotique devrait donc être plutôt envisagé comme un état de quiescence particulier. Ces cellules post-mitotiques ou différenciées ne sont cependant plus capables de contribuer significativement au sein de l'organisme a une réelle augmentation, maintenance ou réparation du tissu.

L'état non prolifératif des cellules quiescentes et des cellules post-mitotiques semble induit et maintenu par des acteurs différents. Il existe néanmoins un tronc commun dans les mécanismes de restriction de leur prolifération, les inhibiteurs Cdk (Cdki). Il a en effet été démontré à l'aide d'un crible d'interférence ARN qu'il est possible de lever cette restriction de prolifération dans ces deux types cellulaires par la simple absence des inhibiteurs de Cyclin dependant kinases (CDKi), sans l'ajout de facteurs mitogènes (Pajalunga et al., 2007). Je reparlerai d'ailleurs plus en détail des ces Cyclin dependant kinases (Cdk) et de leurs inhibiteurs dans le paragraphe 1.2.3 : les points de contrôle du cycle cellulaire.

Concernant les cellules qui se divisent, les cellules mitotiques, leur division n'est pas illimitée. Certaines études semblent même soutenir l'existence d'un lien entre le nombre potentiel de division d'une cellule et la longévité de l'organisme. Par exemple, la tortue des Galapagos, avec une durée de vie dépassant le siècle, posséderait des cellules capables de se diviser plus d'une centaine de fois (Goldstein, 1974) alors que les cellules de souris, vivant environ 2 à 3 ans, auraient une capacité limitée à une quinzaine de cycles. Cette corrélation entre longévité de l'individu et nombre de divisions des cellules a été confirmée par des études comparatives entre espèces (Goldstein and Singal, 1974; Rohme, 1981) mais uniquement démontrée dans des modèles *in vitro*. Elle est connue sous le terme de sénescence réplicative ou limite d'Hayflick (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Certains types cellulaires ne semblent pas soumis à cette sénescence réplicative. C'est notamment le cas des cellules souches de la lignée germinale et des cellules tumorales. L'érosion des télomères à chaque cycle de division est l'hypothèse actuelle la plus solide pour expliquer la sénescence réplicative (Henriques and Ferreira, 2012). Or cette érosion est compensée par l'action d'une enzyme, la télomérase. Une équipe a démontré *in vivo* qu'une réduction artificielle de la longueur des télomères chez des souris déficientes pour l'enzyme télomérase est suffisante pour réduire leur longévité et le nombre de leurs divisions (Vera et al., 2012). Cette télomèrase est fortement exprimée dans les cellules insensibles à la sénescence réplicative alors qu'elle est absente ou faiblement exprimée dans la majorité des cellules somatiques de l'organisme (Collins and Mitchell, 2002) (Forsyth et al., 2002).

1.1.3. Divisions symétriques et asymétriques



<u>Figure 2</u> : Schématisation des divisions symétriques et asymétriques dans le neuroépithélium murin durant la neurogénèse
Avant l'initiation de la neurogénèse le neuro-épithélium se compose essentiellement de cellules souches neurales (CSN) qui constituent ensuite les cellules de la glie radiaire (RGC) lors de l'initiation de la neurogénèse embryonnaire. Ces RGC subissent plusieurs cycles de division symétriques proliératives pour augmenter le stock de cellules progénitrices. Elles entament ensuite des cycles de division asymétriques et génèrent des neurones (N), des progéniteurs intermédiaires (PI) et des cellules de glie radiaire basale (bRG). En fin de neurogénèse, les RGC, les PI et les bRGC effectuent essentiellement des divisions symétriques terminales pour générer un maximum de neurones qui s'organisent en diverses couches au sein de la plaque corticale.
Adapté d'après Paridean et al., EMBO reports, 2014

Il existe deux types majeurs de division des cellules, la division symétrique et la division asymétrique. Cette capacité de « choix » dans le mode de division est réservée aux cellules souches qui peuvent orienter le destin de leur progénie.

Par division, les cellules souches peuvent générer deux nouvelles cellules souches identiques entre elles autant qu'à la cellule souche initiale. Elles peuvent aussi générer deux cellules différenciées, identiques entre elles mais différentes de la cellule souche initiale. Dans ces deux cas on parle de division symétrique, respectivement proliférative et terminale.

Une cellule souche qui se divise peut également générer simultanément une nouvelle cellule souche et une cellule différenciée. On parle alors de division asymétrique, les cellules filles étant différentes entre elles.

La division asymétrique existe dans les épithéliums stratifiés ou pseudo-stratifiés et j'ai choisi pour exemple le cortex des mammifères. Il se compose d'une multicouche de cellules différenciées ayant pour origine embryonnaire une monocouche de cellules souches progénitrices formant le neuro-épithélium, les cellules souches neurales ou cellules de la glie radiaire (Figure 2). Dans les phases précoces du développement embryonnaire ces cellules souches effectuent exclusivement des divisions symétriques prolifératives afin d'amplifier la population de cellules souches progénitrices (Rakic, 1995). Au cours du développement embryonnaire, ces mêmes cellules s'engagent dans plusieurs cycles de divisions asymétriques permettant l'émergence de populations multiples. C'est le début de la neurogénèse (Gotz and Huttner, 2005). Enfin, en phase de neurogénèse terminale des progéniteurs intermédiaires effectuent à leur tour des divisions cellulaires symétriques optimisant ainsi la production massive de cellules différenciées (neurones) (Fietz and Huttner, 2011; Shitamukai and Matsuzaki, 2012).

Cette variation entre les divisions symétriques et asymétriques serait permise par la polarité apico-basale des épithéliums stratifiés et l'orientation de l'axe de division des cellules mitotiques par rapport à cette polarité. De nombreuses études ont largement défendues un contrôle de la division cellulaire à la fois au cours du temps durant le développement mais également dans son orientation au sein du tissu (Gillies and Cabernard, 2011; Morin and Bellaiche, 2011). L'équipe du Dr. Kriegstein a récemment décrit une forte variation de l'axe de division des cellules de la glie radiaire dans des coupes de cerveau de fœtus humain, entre la 12ième et la 18ième semaine de développement embryonnaire, période de transition vers un pic de neurogénèse (LaMonica et al., 2013). Ils n'ont en outre pas retrouvé de diversité similaire dans la variation de l'angle de division pour les progéniteurs intermédiaires, qui ne sont pas soumis à des choix dans leur mode de division. De plus l'existence d'acteurs moléculaires ayant un double rôle à la fois dans la polarité apico-basale

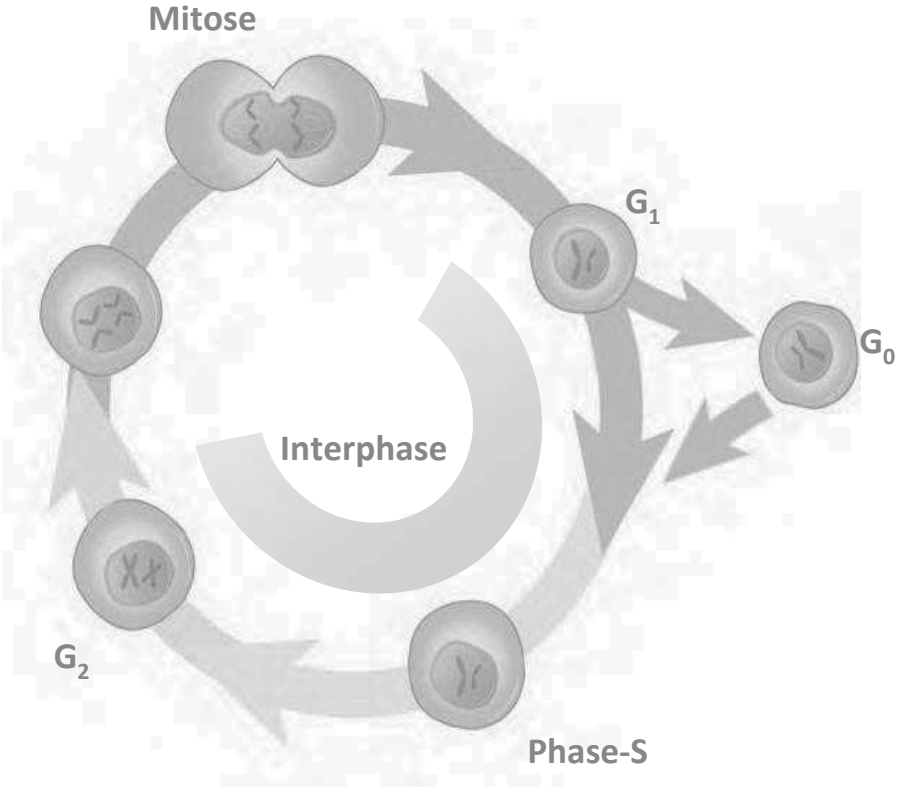


Figure 3 : Schématisation simplifiée de l'enchainement des différentes phases du cycle cellulaire
Voir texte pour détails

et la division cellulaire renforce cet argumentaire (Falnikar et al., 2013; Hehnly and Doxsey, 2012; Machicoane et al., 2014; Saadaoui et al., 2014).
Néanmoins, chez les vertébrés, ce rôle de l'orientation du plan de division fait toujours débat et n'apparait pas comme le facteur unique dans le destin des cellules filles, la majorité des cellules souches neurales ayant des orientations planaires de leur division malgré l'initiation de la neurogénèse. Les rôle de l'adhésion des cellules à la membrane apicale, des jonctions intercellulaires, des centrosomes, du cil primaire et de la séquestration polarisée de déterminants de différentiation, dans le basculement entre division symétrique et asymétrique, sont également discutés (Fietz and Huttner, 2011; Itoh et al., 2013; Morin et al., 2007; Peyre et al., 2011). De plus beaucoup d'études liant l'orientation du plan de clivage et le mode division ont été réalisées chez l'organisme modèle de Drosophile. Malgré la forte conservation de la plupart des gènes avec les mammifères, il semble qu'il y ait de nombreuses divergences. Pour des revues sur la division symétrique/asymétrique voir (Morin and Bellaiche, 2011) ou (Roubinet and Cabernard, 2014).

1.2. Le cycle cellulaire

La durée de la division cellulaire peut varier d'un jour à un an en fonction du type cellulaire. Par exemple les cellules de la muqueuse de l'intestin se divisent tous les 3-5 jours, celles de la peau en 14-28 jours, les cellules sanguines entre 80-120 jours et les cellules du foie tous les 12 mois. Il y aurait chez l'homme adulte 20 millions de cellules qui se divisent toutes les secondes. Les cellules se divisent au travers d'un processus baptisé cycle cellulaire que je détaille ci-après.

1.2.1. L'enchainement des étapes du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est un enchainement précis d'étapes, finement contrôlé (figure 3). Je n'aborde dans ce chapitre que le cycle cellulaire chez les mammifères. Des subtilités et des différences existent chez certains eucaryotes et chez les procaryotes.
Traditionnellement, le cycle celluaire débute par l'interphase, une étape préparatoire à la division cellulaire proprement dite. Initialement l'interphase était considérée comme une phase inerte pour la cellule. Elle correspond aux 9/10ème de la durée de vie d'une cellule. Elle se compose de 3 grandes étapes : la phase G1, la phase S et la phase G2.

Prophase

la chromatine se condense en chromosomes
le centrosome se duplique et les néo-centrosomes migrent aux pôles
l'enveloppe nucléaire se rompt

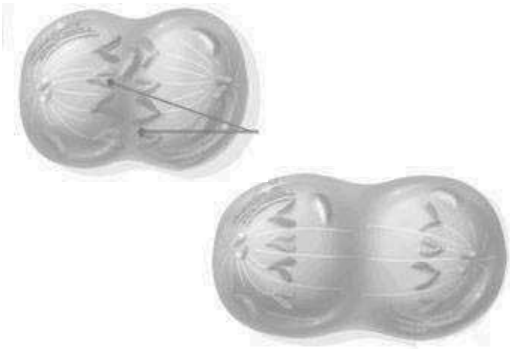
Prométaphase

les microtubules polymérisent à partir des centrosomes et captent les kinétochores

Métaphase

les chromosomes s'alignent à l'équateur

Anaphase



séparation des chromatides sœurs et migration en direction des pôles opposés
initiation du plan de clivage

Télophase

reformation des enveloppes nucléaires
contraction de l'anneau de clivage

Figure 4 : Schématisation des phases de la mitose
Adapté d'après Paquette Jacqueline, blog personnel

La phase G1 (Growth1) est essentiellement une phase de croissance cellulaire durant laquelle la machinerie de la cellule synthétise un grand nombre d'ARN messagers et de protéines en même temps qu'elle augmente son volume. Le contenu cellulaire est dupliqué à l'exception de l'ADN. L'ADN est seulement dupliqué durant la phase S (Synthesis), pour aboutir temporairement à une cellule tétraploïde. La cellule entame alors une nouvelle phase de croissance et de préparation à la mitose, la phase G2 (Growth2). En fin de G2 les chromosomes dupliqués sont lâchement jointifs et les chromatides sœurs s'ébauchent.

1.2.2. La mitose

La mitose se compose de 4 à 5 phases distinctes en fonction des auteurs (figure 4).

La prophase : Durant la prophase, l'enveloppe nucléaire qui séquestre le matériel génétique se rompt, les chromosomes se condensent en maintenant jointives les deux chromatides sœurs par une structure centrale, le centromère. Une structure appelée le centrosome se duplique et chaque centrosome migre aux deux pôles opposés de la cellule.

La prométaphase : Les centrosomes servent de centre nucléateur de la tubuline. Des microtubules astraux et polaires vont polymériser à partir de ces centrosomes. Les microtubules polaires s'attachent aux chromosomes, grâce à des complexes moléculaires au niveau de leurs centromères, les kinétochores, puis organisent leur migration sur le plan équatorial de la cellule.

La métaphase : L'alignement parfait des chromosomes sur le plan équatorial est obtenu pendant la métaphase. Chaque chromatide sœur est maintenant ancrée au niveau du kinétochore à deux faisceaux de microtubules polaires, de part et d'autre du centromère, chaque fibre de microtubules venant d'un pôle opposé.

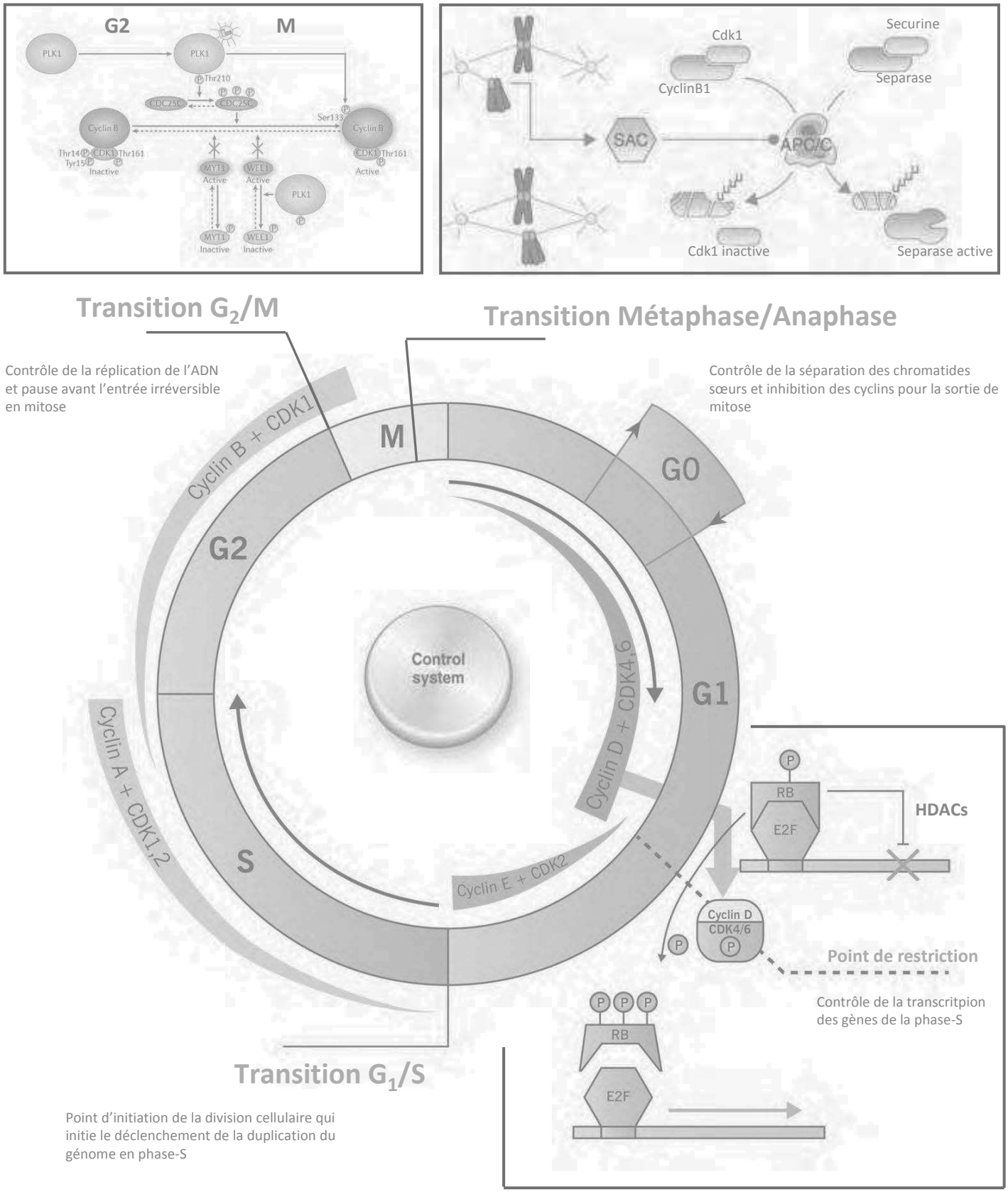
L'anaphase : L'anaphase est une étape très rapide. Chaque chromatide sœur est tractée en direction opposée vers les centrosomes polaires par un mécanisme de dépolarisation/rétraction des microtubules. Des microtubules apparaissent entre les 2 lots de chromatides sœurs et repoussent, par polymérisation, les chromatides en

direction opposée. Ces microtubules composent le fuseau central. Les microtubules astraux interviennent eux dans la stabilisation de la géométrie cellulaire et l'orientation du fuseau mitotique, en interagissant entre autre avec le cortex de la cellule.

La télophase : La télophase est la dernière étape qui compose la mitose. Une nouvelle enveloppe nucléaire apparait autour de chaque lot de chromatides. On aboutit à la formation de deux noyaux au sein desquels les chromosomes entament leurs décompactions. Les nucléoles réapparaissent également au sein de ces noyaux. Une invagination de la membrane se met en place sur le plan équatorial par l'action de microfilaments d'acto-myosine. Cette bande contractile pince la cellule et réduit l'espace inter-membranaire, c'est la formation de l'anneau de clivage qui initie la séparation des cytosols des deux futures cellules filles. La séparation totale des deux cellules filles en deux entités distinctes est réalisée par une ultime phase, historiquement intégrée à la mitose, la cytocinèse. Cette phase de cytocinèse n'est aujourd'hui plus considérée seulement comme une étape accessoire de la mitose mais comme une phase à part entière. Elle est décrite en détail dans le chapitre 1.3 : La cytocinèse.

1.2.3. Les points de contrôle du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire se réalise par un enchainement synchronisé d'étapes successives complexes. La transition vers l'étape suivante est un évènement critique pour la cellule et doit être extrêmement contrôlé en amont. Des points de contrôle stricts existent et permettent de différer l'entrée dans la phase suivante, laissant ainsi le temps à la cellule de détecter puis corriger les anomalies éventuelles. Chaque point de contrôle de chaque étape détermine donc si la cellule est prête à progresser vers la phase suivante, après avoir vérifié que tous les pré-requis au bon déroulement de la future phase ont été réunis (Hartwell and Weinert, 1989). Ces points de contrôle sont communément dénommés dans leur terminologie anglophone : « checkpoint ».
Trois transitions majeures sont strictement contrôlées : il s'agit des transitions G1-phase S, G2-Mitose et métaphase-anaphase (figure 5).



<u>Figure 5</u> : Les points de contrôle du cycle cellulaire

Adapté d'après Wong E.et al. , Nat Rev Genet, 2008, d'après Lara-Gonzalez P.et al., Curr Biol, 2012 et d'après Ziyouni S., Nature Rev MCB, 2014

A la transition G1-phase S, deux complexes de kinases CDK4-6/cyclinD et CDK2/cyclin E agissent de concert pour lever l'inhibition de la transcription des gènes imposée par les protéines Rb via la fixation d'E2F, aussi appelé point de restriction (figure 5 en bas à droite). Les CDK (Cyclin Dependant Kinase) sont des kinases et donc les unités catalytiques du complexe. Les cyclines sont les unités régulatrices qui permettent d'activer les CDK et dont la concentration varie au cours du cycle cellulaire. Durant la phase G1 la protéine Rb faiblement phosphorylée fixe le facteur de transcription E2F et recrute des HDACs (Histones déacétylases) pour bloquer la transcription de certains gènes. Les complexes CDK4-6/cyclinD et CDK2/cyclinE phosphorylent la protéine Rb, induisant sa dissociation d'avec E2F et levant l'inhibition de la transcription des gènes nécessaires à la réalisation de la phase-S (pour une revue voir (Malumbres and Barbacid, 2009)).

La transition G2-Mitose est une étape de contrôle de la réplication correcte de l'ADN (figure5 en haut à gauche). L'activité des complexes CDK1/cyclinB et CDK1/cyclinA est ici primordiale. L'activité de CDK1 est inhibée durant la phase G2 par phosphorylation induite par les kinases Wee1 et Myt1. Durant la progression de la cellule à travers la phase G2, une autre kinase, polo kinase 1 (plk1), inhibe Myt1 et Wee1 et active la phosphatase CDC25, levant *de facto* l'inhibition de CDK1 (Watanabe et al., 2004).

La transition métaphase-anaphase, souvent considérée comme le point le plus critique de la division cellulaire, permet de correctement partitionner le patrimoine génétique (figure 5 en haut à droite). A la fin de la métaphase les deux chromatides sœurs appariées sont ancrées aux microtubules polaires en un point unique, le kinétochore, assurant que chaque chromatide est liée à des microtubules émanant de pôles opposés. Dans cette transition l'un des acteurs clé est le complexe APC (Anaphase Promoting Complex). Il s'agit d'un large complexe de plus d'une dizaine de sous-unités dont la principale fonction est d'étiqueter des protéines cibles avec des molécules d'ubiquitine, pour qu'elles soient dirigées vers le protéasome et dégradées. Tout d'abord, le complexe APC^{CDC20} dégrade la sécurine et dissocie ainsi le complexe sécurine/séparase. Cette séparase libre est une enzyme qui va dégrader la molécule responsable de la cohésion des deux chromatides sœurs, la cohésine. En parallèle et après activation par CDC20, APC^{CDC20} induit la dégradation des cyclinB et par cascade l'inactivation des CDKs permettant à la cellule d'initier la sortie de la mitose (Clijsters et al., 2014).

1.2.4. Le « Spindle Assembly Checkpoint » (SAC)

Après la réplication de l'ADN en phase-S, les chromosomes sont constitués d'une paire de chromatides sœurs maintenues par un complexe protéique, la cohésine, et attachés aux microtubules par un autre complexe, le kinétochore. Afin d'assurer la ségrégation égale des chromatides lors de l'anaphase tous les kinétochores doivent être attachés par des microtubules du fuseau mitotique. Dans la configuration où certains kinétochores sont libres, le Spindle Assembly Checkpoint (SAC) est actif et via la protéine Mad2 inhibe la formation du complexe APC avec ces partenaires (Vazquez-Novelle et al., 2014). Une équipe a démontrée que les protéines Mad2 et le complexe APC sont en compétition pour la fixation sur le même site de Cdc20. Dans des cellules HeLa, un mutant de Cdc20 ($Cdc20^{R132A}$) incapable de fixer de façon stable Mad2, n'est pas soumis au contrôle du SAC et la protéine cyclinB1 est dégradée de façon plus rapide que dans les contrôles, attestant d'une continuité de la progression du cycle cellulaire et d'une fixation de APC et Cdc20 (Izawa and Pines, 2012). De plus et afin d'assurer la ségrégation de chacune des deux chromatides dans deux futures cellules filles différentes, il est indispensable que chacun des kinétochores du même chromosome soit capturés par des microtubules venant des pôles opposés : c'est le principe de la bi-orientation. L'attachement des microtubules aux kinétochores se fait de manière stochastique. Le CPC détecte les appariements non bi-orientés, ré-active le SAC et déstabilise les attachements incorrects (Tanaka and Desai, 2008). Il retarde ainsi le déclenchement de l'anaphase tant que tous les kinétochores ne sont pas attachés et correctement bi-orientés (Khodjakov and Pines, 2010).

1.2.5. AuroraB et le Chromosomal Passenger Complex (CPC)

Dans les années 1970, Nicklas observe grâce à des expériences de micromanipulation que la bi-orientation est dépendante de la tension exercée sur les chromosomes (Nicklas and Koch, 1969). La protéine Ipl (Increase-in-ploidy) identifiée chez la levure (Chan and Botstein, 1993) puis ses homologues les kinases Aurora, identifiées chez les mammifères (Giet and Prigent, 1999) sont les acteurs moléculaires de ce système de bi-orientation. Les concepts de tension au point d'attachement des chromosomes et de phosphorylations dépendantes d'AuroraB

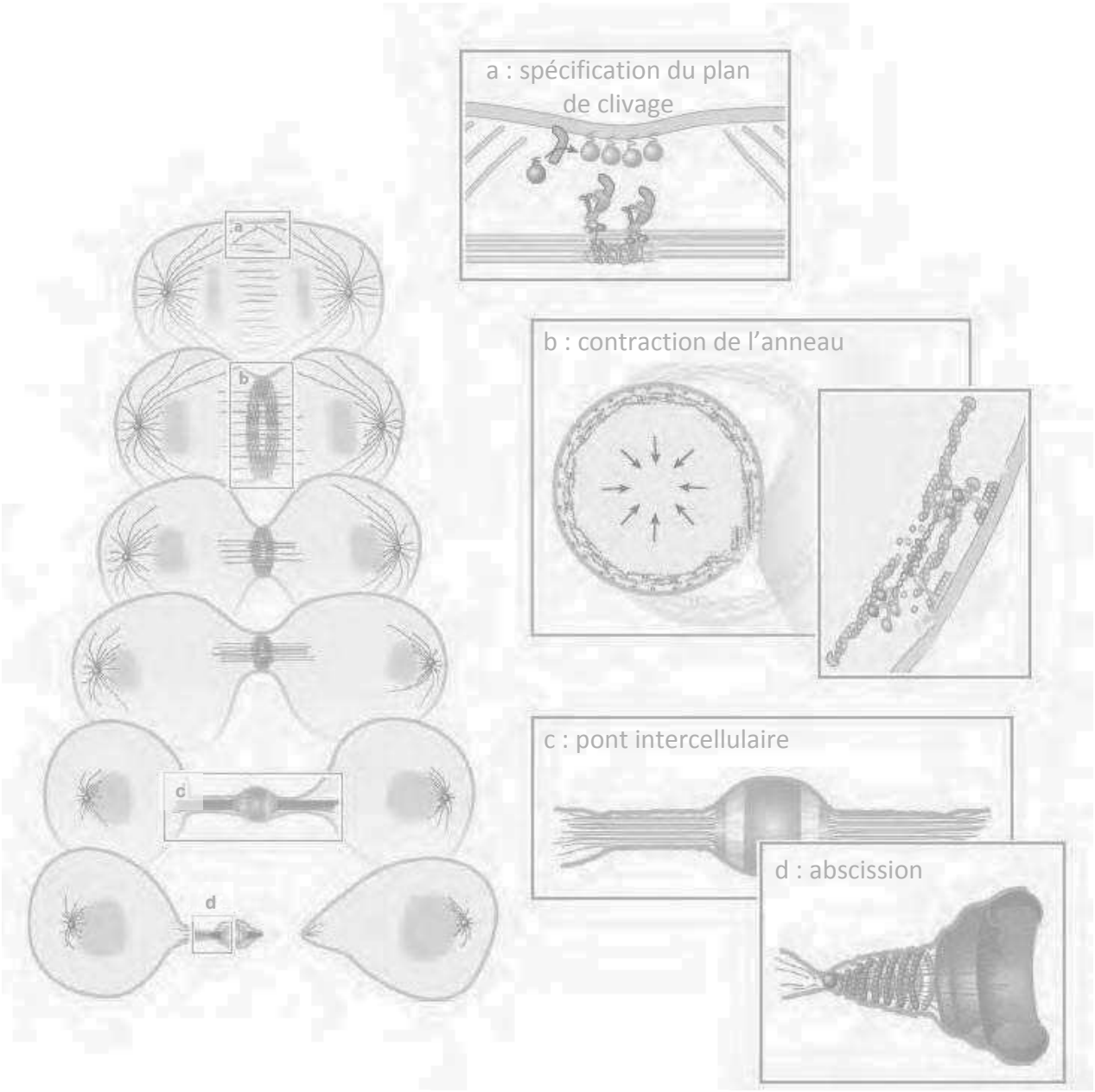


Figure 6 : La cytocinèse, grandes étapes
En métaphase, la définition d'un plan de clivage (a) déterminera le site de positionnement d'un anneau contractile (b) qui par constriction mécanique aboutira à la formation d'une structure tubulaire fine, le pont intercellulaire (c) entre les deux cellules filles. Cette structure sera résorbée durant l'abscission (d) aboutissant à la séparation complète des deux cellules filles.
Adapté d'après Green R., Annu, Rev Dev Cell, 2012.

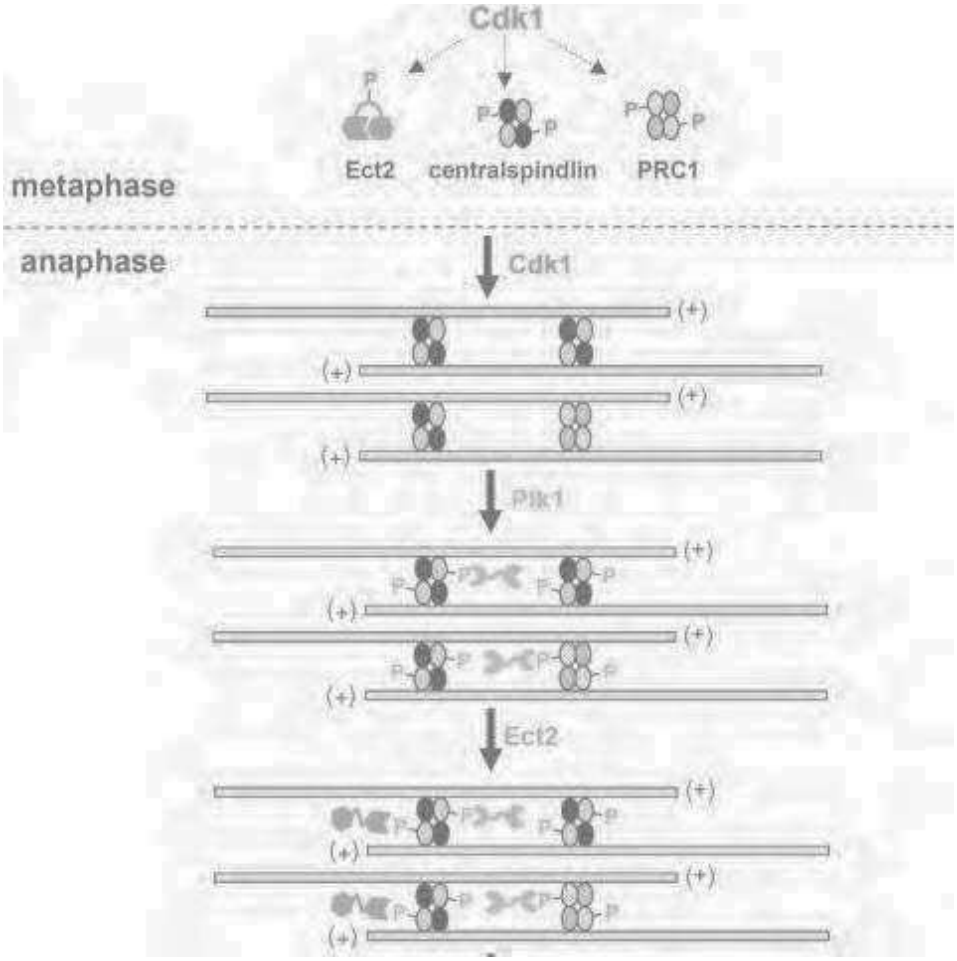
seront réunis bien plus tard pour proposer le modèle actuel. La tension exercée sur les kinétochores bi-orientées limite l'accès d'AuroraB à ces cibles kinétochoriennes par éloignement spatial (Liu et al., 2009).
AuroraB fait partie du complexe CPC (Chromosomal Passenger Complex) avec les protéines INCENP, Survivine et Boréaline (Ruchaud et al., 2007), (Bishop and Schumacher, 2002),(Sampath et al., 2004; Speliotes et al., 2000). Ce complexe est présent au niveau des kinétochores internes en métaphase. AuroraB est active par autophosphorylation sur un résidu thréonine après association avec son co-activateur INCENP (Yasui et al., 2004). En l'absence de tension suffisante exercée par les microtubules au niveau des kinétochores, le gradient de phosphorylation d'AuroraB atteint des cibles kinétochoriennes et induit la dissociation de l'attachement aux microtubules. Si la tension est suffisante, l'éloignement spatial prévient la phosphorylation de ces cibles et permet la progression vers l'Anaphase (Liu et al., 2009).

1.3. La cytocinèse

1.3.1. Définition et introduction sur la cytocinèse

La cytocinèse, ou cytodiérèse, est l'étape ultime de la division cellulaire.
La mitose qui vient de s'achever a permis de partitionner de façon égale les chromatides sœurs répliquées en phase-S. L'apparition d'un anneau de clivage et sa contraction durant la télophase ont permis l'ébauche des deux cellules filles. Les cytoplasmes de ces cellules filles post-mitotiques sont cependant toujours connectés entre eux, par une structure tubulaire appelée pont-intercellulaire. La cytocinèse, qui pourrait être traduite du grec comme le « mouvement des cytosols », est en fait l'ensemble des étapes qui vont de l'initiation du pont intercellulaire à la séparation complète des cellules filles, aussi appelée abscission.

Les mécanismes de cytocinèse varient selon les organismes mais conservent quatre caractéristiques communes : la définition d'un plan de clivage, l'assemblage d'une structure équatoriale, la séparation du cytoplasme et l'abscission (figure 6) (Guertin et al., 2002). Le processus de cytocinèse débute dès l'anaphase lorsque la cellule définit le site de clivage par rapport au positionnement des chromatides sœurs tractées vers les pôles et séparées par le fuseau central. A partir de ce territoire, la cellule débute l'assemblage d'un anneau



<u>Figure 7</u> : La cytocinèse : L'assemblage du fuseau central
L'inactivation de Cdk1 en Anaphase permet la localisation et l'ancrage de PRC1 aux extrémités positives des microtubules.
Le complexe Centralspindlin, composé des sous unités de MKLP1 et MgcRacGAP, se positionne au niveau des extrémités positives des microtubules, renforçant leur cohésion.
Ces complexes sont ensuite phosphorylés par PlK1.
La phosphorylation de MgcRacGAP permet le recrutement d'Ect2, préalable à la spécification du plan de clivage
Adapté d'après Burkard ME, Plos Biol, 2009.

contractile. La contraction de cet anneau délimite le futur site de séparation des deux cellules filles. En parallèle de la constriction progressive de l'anneau contractile, le trafic vésiculaire organise le transport et la fusion des membranes au site de clivage et finalise la séparation des cellules filles.

1.3.2. L'assemblage du fuseau central

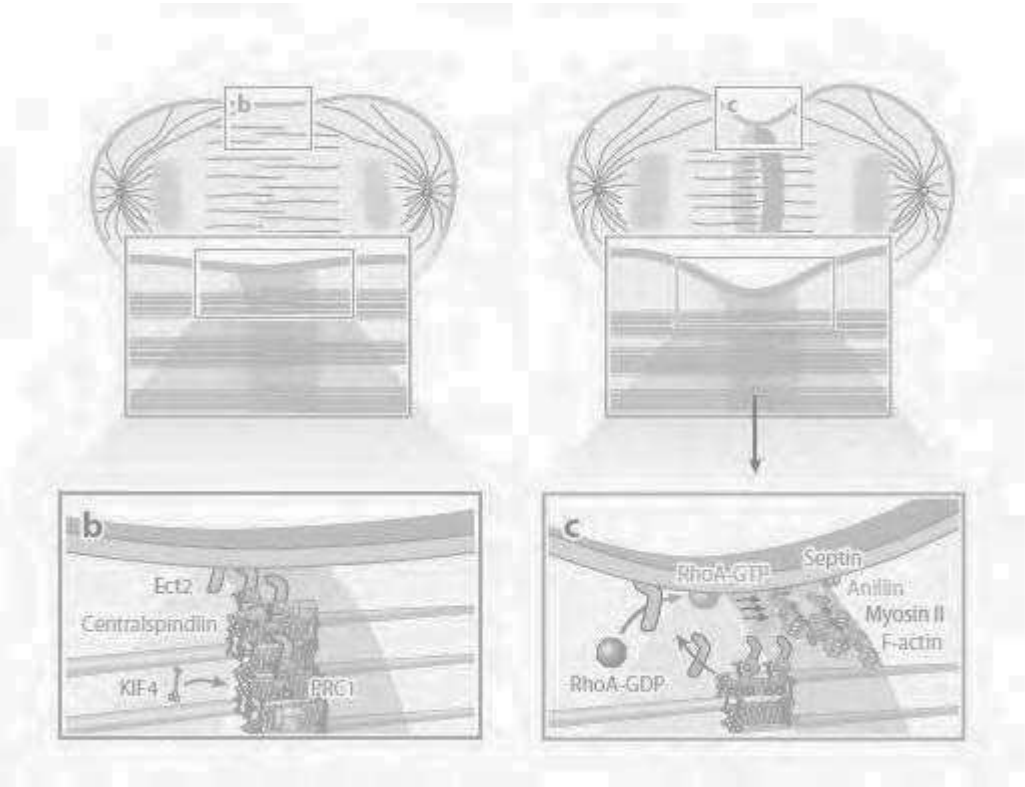
L'une des étapes premières de la cytocinèse est l'assemblage d'un fuseau de microtubules antiparallèles entre les deux lots de chromatides sœurs. Cette structure est appelée le fuseau central et regroupe en plus des microtubules, des protéines motrices (kinésines) associées aux microtubules et des protéines kinases (plk1) (figure 7) (Glotzer, 2009). Les microtubules qui le composent sont issus pour partie des microtubules interpolaires du fuseau en métaphase mais également d'une polymérisation à partir des points de nucléation non centrosomaux et des complexes d'augmin (Uehara and Goshima, 2010; Uehara et al., 2009). L'ancrage des extrémités positives des microtubules en position équatoriale est assuré par la protéine PRC1 (protein required for cytokinesis1) (Jiang et al., 1998; Shrestha et al.). Aussi, les cellules déplétées en protéine PRC1 ne sont plus capables d'organiser la formation du réseau de microtubules antiparallèles et refusionnent au lieu d'achever la cytocinèse (Mollinari et al., 2005). PRC1 est essentiel pour polariser les microtubules du fuseau central et organiser le recrutement et la concentration des protéines responsables de l'assemblage de l'anneau de clivage comme la protéine polo kinase 1 (plk1). D'un point de vue moléculaire PRC1 est inhibée jusqu'au début de l'anaphase par phosphorylation dépendante de CDK1 puis, en tant qu'homodimère, se fixe à l'interface des microtubules anti-parallèles (Subramanian et al., 2010). Une seconde protéine, la kinésine Kif4A, localisée uniquement aux extrémités positives des microtubules, régule l'élongation des microtubules du fuseau central durant l'anaphase (Hu et al., 2011; Shrestha et al., 2012; Subramanian et al., 2013). Par des expériences d'ARN interférences une équipe a décrit que Kif4A limite l'élongation des microtubules durant l'anaphase tardive dans des cellules HeLa et observée, en l'absence de Kif4A, des cellules avec un fuseau central anormalement long (Hu et al., 2011).

Un second complexe moléculaire est primordial dans la formation du fuseau central, c'est le complexe centralspindlin qui est un tétramère composé de deux copies de la kinésine MKLP1 (ou CHO1), une protéine motrice, et de la protéine activatrice de GTPase de la famille Rho,

MgcRacGAP (ou Cyk-4) (Mishima et al., 2002; Pavicic-Kaltenbrunner et al., 2007). A la différence du complexe centralspindlin complet, ni MKLP1 ni MgcRacGAP ne peuvent réaliser seul le regroupement des microtubules *in vitro*. L'affinité de MKLP1 pour les microtubules est régulée de façon négative par phosphorylation de son domaine moteur par CDK1 (Mishima et al., 2004). Durant l'anaphase, AuroraB phosphoryle MKLP1 sur un résidu serine juxtaposé au site de fixation d'une autre protéine 14-3-3. 14-3-3 est une protéine qui empêche l'oligomérisation de MKLP1. La phosphorylation de MKLP1 par AuroraB antagonise la fixation de 14-3-3 et lève son inhibition sur la dimérisation de MKLP1 et la formation du complexe centralspindlin (Douglas et al., 2010).
La seconde unité du complexe centralspindlin, MgcRacGAp, a un rôle plus tardif que MKLP1. Il permet la concentration et l'activation de la protéine RhoA dans la zone équatoriale, qui servira à la spécification du plan de clivage et que je détaille dans le paragraphe suivant. Il permet également l'ancrage à la membrane plasmique au niveau du plan équatorial via son domaine C1 (Lekomtsev et al., 2012). Les auteurs de cette étude décrivent qu'une mutation dans le domaine C1 de MgcRacGAP empêche, dans des cellules humaines et de poulet, l'association de cette protéine à la membrane et induit des défauts de cytocinèse. Un ancrage artificiel à la membrane du complexe centralspindlin en présence de cette mutation de MgcRacGAP est suffisant pour rétablir une division cellulaire normale (Lekomtsev et al., 2012).

1.3.3. La spécification du plan de clivage

La spécification du plan de clivage se fait durant l'anaphase précoce. Le positionnement précis de ce plan de séparation des cytosols est essentiel pour prévenir la perte de chromosome lors de la ségrégation des chromatides sœurs. Deux signaux semblent capitaux pour le bon positionnement spatial de cette zone de clivage : l'un venant du fuseau central, le second du fuseau astral (Bringmann and Hyman, 2005; Bringmann et al., 2004), (Werner et al., 2007). Ces deux réseaux de microtubules astraux et centraux constituent le fuseau mitotique et assurent le couplage entre invagination de la membrane au site définit par le plan de clivage et ségrégation des chromatides sœurs (Inoue et al., 2004). La création d'un gradient équatorial de concentration et d'activité de la GTPase RhoA est la clé de la définition du plan de clivage (figure 8).



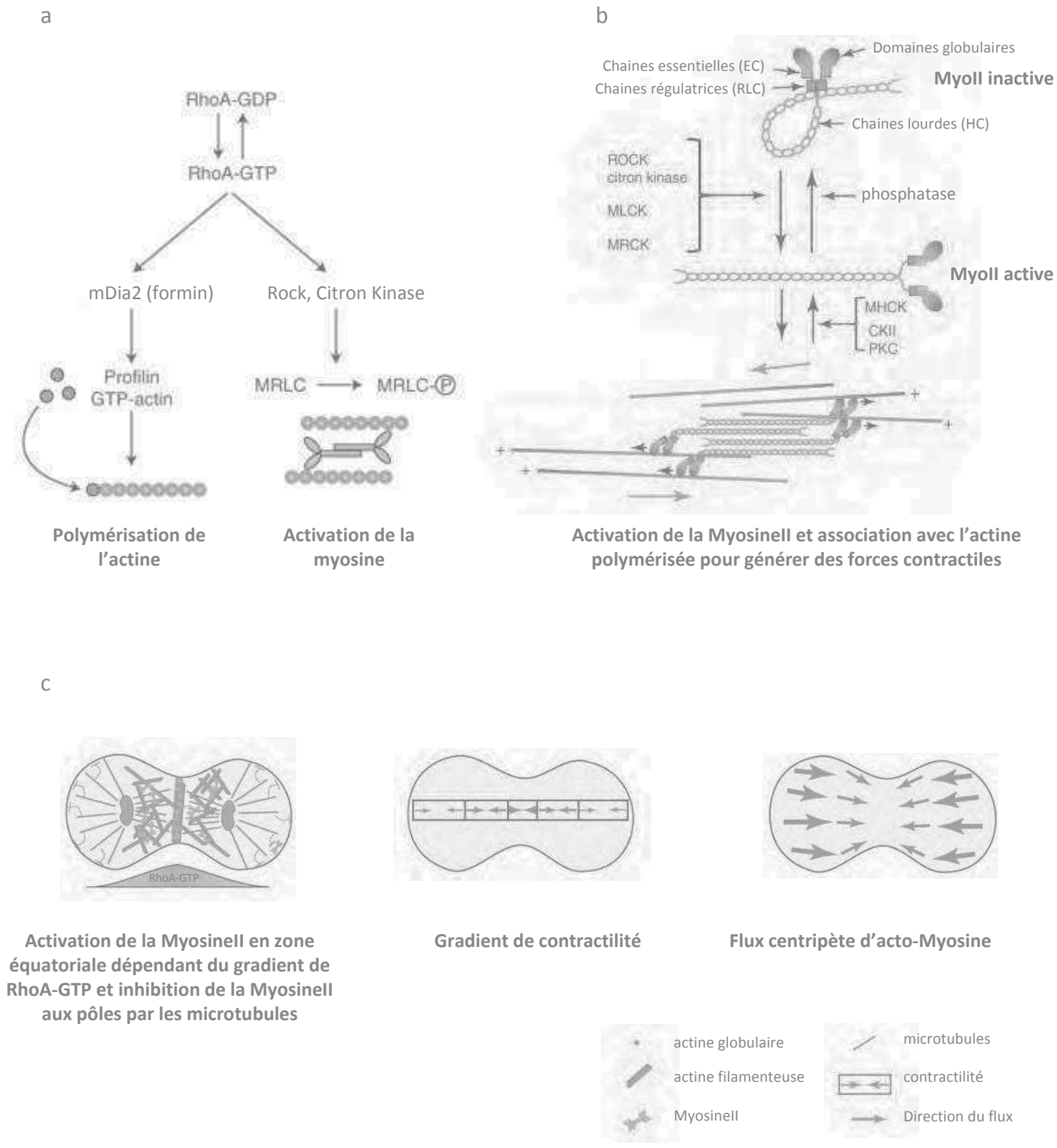
<u>Figure 8</u> : La cytocinèse : la spécification du plan de clivage
PRC1 recrute Kif4 aux extrémités positives des microtubules et Kif4 limite leur polymérisation.
Ect2 ancre le complexe du fuseau central au cortex via Centralspindlin et converti RhoA-GDP en sa forme active RhoA-GTP. L'interaction entre Anilline et Centralspindlin connecte les microtubules du fuseau à l'anneau contractile composé essentiellement de MyosineII et d'actine filamenteuse.
Adapté d'après Green RA, Annu, Rev Cell Dev Biol, 2012

Le recrutement et l'activation de RhoA dépend du complexe centralspindlin, en particulier de MgcRacGAP, et de la protéine Ect2 (Nishimura and Yonemura, 2006; Yuce et al., 2005). En détail, la protéine MgcRacGAP, séquestrée au niveau du chevauchement équatorial des microtubules, est doublement phosphorylée par polo kinase (Plk1) puis recrute la protéine GEF-Ect2 (Kim et al., 2014). La partie c-terminale d'Ect2 se fixe sur MgcRacGAP alors que la partie n-terminale d'Ect2, qui contient un domaine PH (Plecstrin Homology), assure son activité GEF. La présence contradictoire d'une GAP inhibitrice, MgcRacGAP, dont dépend la localisation d'une GEF activatrice, Ect2, pour réguler l'activité de RhoA sur le plan équatorial fait encore débat aujourd'hui. Deux hypothèses sont proposées pour expliquer ce paradoxe : cela permettrait une très forte dynamique de l'activation et de l'inhibition de RhoA nécessaire à la flexibilité du positionnement du plan de clivage (Miller and Bement, 2009) et/ou cela permettrait, si l'on considère que l'activité inhibitrice de MgcRacGap est dirigée uniquement contre une autre GTPase, Rac en l'occurence, d'inhiber la formation de branchements d'actine en zone équatoriale via le contrôle du complexe Arp2/3 (Canman et al., 2008). En outre, au niveau du fuseau central, le domaine PH de la protéine Ect2 permet l'interaction avec une autre protéine, Anilline qui stabilise le fuseau central de microtubules au niveau cortical renforçant la définition spatiale de la zone d'activation de RhoA à l'équateur (Frenette et al., 2012).

Les propriétés mécaniques des microtubules du fuseau mitotiques pourraient également avoir un rôle dans l'établissement du plan de clivage. L'hypothèse d'une zone de faible densité en microtubules permettrait le positionnement du plan de clivage à l'équateur, ce positionnement n'étant pas possible dans les zones riches en microtubules (Dechant and Glotzer, 2003). Une seconde hypothèse propose que les microtubules de type stables favorisent la contractilité équatoriale alors que les microtubules dynamiques inhibent cette contractilité aux pôles (Foe and von Dassow, 2008; Odell and Foe, 2008). Au-delà de ces deux hypothèses, une distance minimale séparant les centrosomes semble nécessaire à l'initiation du plan de clivage. Chez le nématode C. elegans, un rapprochement des asters empêche à la fois l'induction et la polymérisation du fuseau central (Lewellyn et al., 2010).

1.3.4. L'assemblage et la contraction de l'anneau de clivage

L'activation de RhoA et sa restriction en zone équatoriale est à l'origine de deux voies de signalisation parallèles (figure 9a). RhoA, via la protéine effectrice mDia2, permet la



<u>Figure 9</u> : La cytocinèse : l'anneau contractile

Le gradient d'activité de RhoA, concentrée en zone équatoriale, permet la polymérisation de l'actine globulaire en actine filamenteuse (a) et l'activation de la myosineII (a et b).

L'interaction entre la myosineII activée et l'actine filamenteuse permet la génération de forces contractiles (b).

Le gradient de RhoA-GTP amplifie les forces contractiles à l'équateur alors que les microtubules atténuent ces forces en région polaire générant un gradient de contractilité et un flux centripète d'acto-myosine (c).

Adapté d'après Levayer R., Trends in Cell Biology, 2012

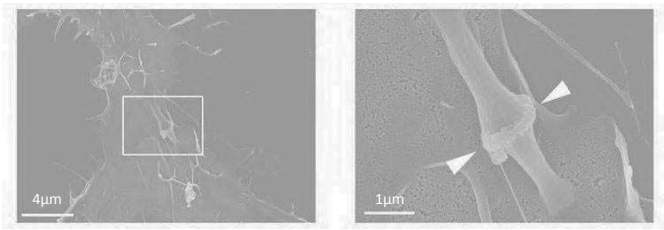
nucléation et la polymérisation de l'actine globulaire en actine filamenteuse. mDia2 s'accumule au niveau de l'anneau de clivage et la déplétion de mDia2 dans des fibroblastes induit la formation de cellules binucléées et des contractions corticales ectopiques (Watanabe et al., 2008). RhoA permet également l'activation de la protéine motrice myosineII (MyoII), générant ainsi des forces suffisantes pour former un anneau contractile (Mendes Pinto et al., 2013).

La contractilité cellulaire est la capacité d'une cellule à générer des tensions suffisantes et de façon autonome. Elle est biochimiquement induite par l'interaction entre des filaments d'actine, la protéine motrice MyoII et des protéines stabilisatrices (Bendix et al., 2008; Koenderink et al., 2009).

La MyoII est un hexamère formé de deux chaines lourdes (HC), deux chaines essentielles (EC) et deux chaines régulatrices (RLC) (figure 9b). Ces hexamères de MyoII s'assemblent tête bèche avec un second hexamère sous forme de minifilaments bipolaires qui exercent leur force en migrant sur des filaments d'actine antiparallèles (Finer et al., 1994). La phosphorylation des chaînes régulatrices de la MyoII, induit des changements de conformation des chaines lourdes, permet l'assemblage des hexamères sous forme de minifilaments, l'activité ATPase et la fixation à l'actine. En détail, la phosphorylation des chaines régulatrices de la MyoII s'effectue sur des résidus hautement conservés (Thr18 et Ser19) et peut être réalisée par plusieurs serine-thréonine kinases dont ROCK (Rho-associated coiled coil-containing kinase), citron kinase, MRCK (myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase) et MLCK (myosin ligth chain kinase) (figure 9b) (D'Avino et al., 2004; Matsumura, 2005). ROCK et citron kinase sont toutes les deux activées par RhoA. L'activité motrice de la MyoII est assurée par la partie n-terminale du domaine globulaire de la chaine lourde qui contient les sites de fixation à l'actine et de l'ATP. L'hydrolyse de l'ATP fournie l'énergie nécessaire au changement conformationnel qui induit les mouvements d'actine tandis que la dissociation de l'ADP et sa substitution par une nouvelle molécule d'ATP permet le détachement de l'actine (Rayment et al., 1993). L'existence d'un gradient de RhoA-GTP en zone équatoriale crée un enrichissement local des forces contractiles (figure 9c).

En plus de l'actine et de la MyoII, l'anneau contractile contient d'autres protéines et notamment la protéine plateforme Anilline. Anilline est capable de lier RhoA, l'actine filamenteuse et la MyoII (Piekny and Glotzer, 2008). Elle se localise également sur les microtubules et est capable de fixer les microtubules *in vitro* (Tse et al., 2011). Elle interagit également avec les septines au niveau de l'anneau contractile, pour assurer le recyclage de

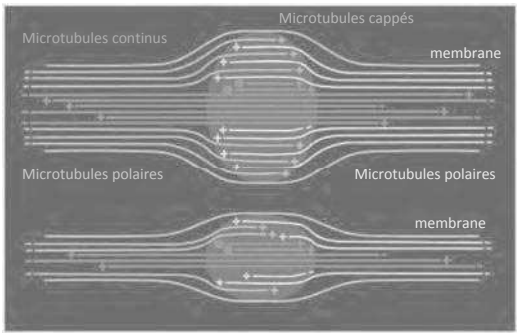
a



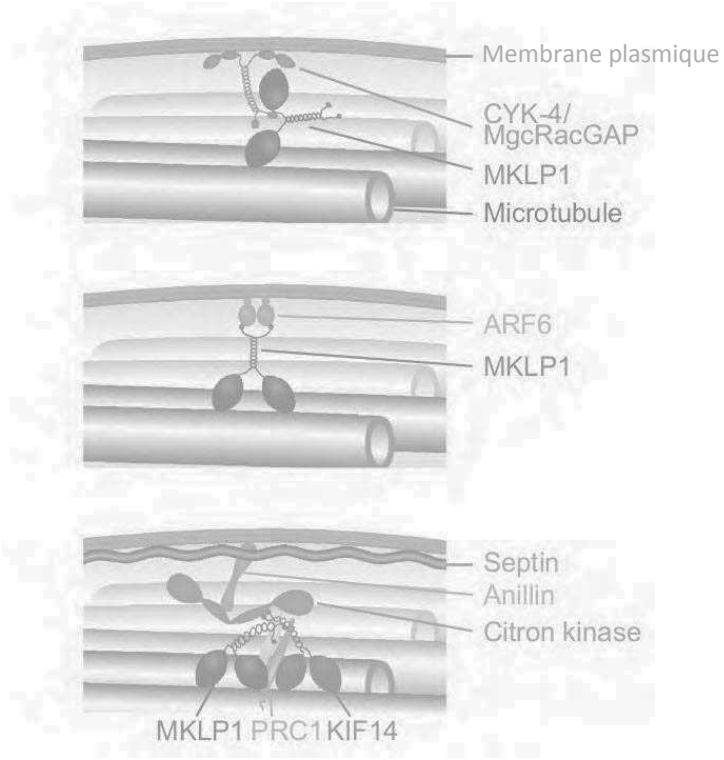
b

Pont intercellulaire néo-formé

Pont intercellulaire mature



c



<u>Figure 10</u> : La cytocinèse : le pont intercellulaire

a- Pont intercellulaire dans des cellules HeLa observées en microscopie électronique à balayage. *D'après Crowell EF et al., J Cell Science, 2014*.

b- Modèle d'enchevêtrement des microtubules au niveau du pont intercellulaire et du midbody. *D'après Elad N. et al., J Cell Science, 2011*.

c- Interaction des protéines du fuseau responsables de l'ancrage au cortex. *D'après Mierzwa B. et al, Dev Cell, 2014*.

l'excès de membrane plasmique tout au long de la réduction du diamètre de l'anneau (El Amine et al., 2013).
Mécaniquement, l'anneau contractile se resserre donc autour du fuseau central jusqu'à former une structure tubulaire, le pont intercellulaire. La plupart des protéines du fuseau central se retrouvent entrainées dans cette dynamique et sont séquestrées au sein du pont intercellulaire.

1.4. Le pont intercellulaire et le midbody

Initialement le pont intercellulaire a été identifié comme une structure dense aux électrons contenant essentiellement des microtubules antiparallèles, se chevauchant au centre du pont dans une zone que l'on appelle le « midbody » ou « Flemming body » du nom de l'un de ses découvreurs (Flemming, 1965; Mullins and Biesele, 1977). Il a ensuite été décrit comme une structure tubulaire par des expériences de micro-injection de cellules de mammifères *in vitro* et les auteurs ont mis en évidence la diffusion de molécules de la première cellule fille à la seconde, via ce pont (Schulze and Blose, 1984). Aujourd'hui sa composition détaillée s'est étoffée d'une multitude de facteurs, présents au niveau de ce pont et du midbody. Le pont intercellulaire est en fait la contraction extrême de l'anneau de clivage avec un diamètre moyen de 1-2µm et va persister jusqu'à la séparation des cellules filles lors de l'abscission (figure 10a). Durant sa maturation sa taille va se réduire de plus de la moitié de son diamètre initial (Schiel et al., 2012). La partie centrale de ce pont, le midbody, agit comme une plateforme de recrutement de la machinerie moléculaire nécessaire à l'abscission (Lafaurie-Janvore and Piel, 2013). Deux études majeures de protéomique et de crible RNAi ont permis de dresser une liste d'acteurs potentiels dans la cytocinèse en essayant de définir la composition exhaustive du pont intercellulaire (Echard et al., 2004; Skop et al., 2004).

1.4.1. Les composants du pont

1.4.1.1. Les microtubules

Historiquement le pont intercellulaire a été identifié par son opacité résultant de sa densité extrême en microtubules (McIntosh and Landis, 1971). Ces microtubules sont le reliquat du

fuseau central d'anaphase qui a été condensé pendant la contraction de l'anneau d'acto-myosine et sont donc toujours orientés de façon antiparallèle, leurs extrémités positives vers le centre du pont et leurs extrémités négatives orientées vers le cytosol des cellules filles. Les extrémités positives de ces microtubules se chevauchent au centre du midbody (figure 10b). La densité des microtubules dans cette zone est telle qu'il est très difficile de l'étudier par des techniques d'imagerie conventionnelle due à l'incapacité des anticorps d'y pénétrer. Une étude basée sur l'utilisation de la cryo-électro tomographie a récemment pénétrée cette zone et détaillée l'enchevêtrement des microtubules (Elad et al., 2011). Ils ont ainsi démontrés que le midbody se compose en son cœur de microtubules traversant cette zone (microtubules continus) entourés de microtubules dont les extrémités s'achèvent dans cette zone (microtubules polaires). Les microtubules au sein de ce midbody sont des microtubules très stables comme le confirme leur acétylation et leur relative résistance aux drogues dépolymérisantes tel le Nocodazole (Foe and von Dassow, 2008; Piperno et al., 1987; Rosa et al., 2006).

Si la présence des microtubules apparait indispensable dans l'établissement du pont intercellulaire, notamment pour permettre l'orientation du trafic vésiculaire, une étude à tout de même montré chez C. elegans, qu'il était possible de réaliser l'abscission des cellules indépendamment de la présence de microtubules dans le midbody (Green et al., 2013). Après avoir déplété les microtubules du midbody par ARN interférence les auteurs n'ont pas observé de délai dans l'invagination du fuseau central comparativement aux embryons contrôles. Ils n'ont également pas observé de différences dans le recrutement du complexe ESCRT ou le relargage du midbody.

1.4.1.2. Les protéines en provenance du fuseau

Durant la formation du pont intercellulaire, les composants du fuseau central vont se relocaliser dans divers domaines du pont intercellulaire puis du midbody. Le midbody peut être compartimenté en trois espaces : le renflement, le trou noir et la zone périphérique. Les kinésines Kif4 et PRC1, associés aux microtubules, vont se concentrer au sein du midbody dans la structure la plus centrale, le trou noir (Hu et al., 2012). Elles vont former un feuillet de deux bandes parallèles séparées par un espace imperméable à tout immunomarquage. Les protéines CENP-E, MKLP2 et AuroraB se localisent elles aussi sur les microtubules mais dans une zone périphérique au trou noir, encadrant latéralement le couple Kif4/PRC1 (Murata-Hori and Wang, 2002). Enfin, la plupart des protéines qui constituaient l'anneau

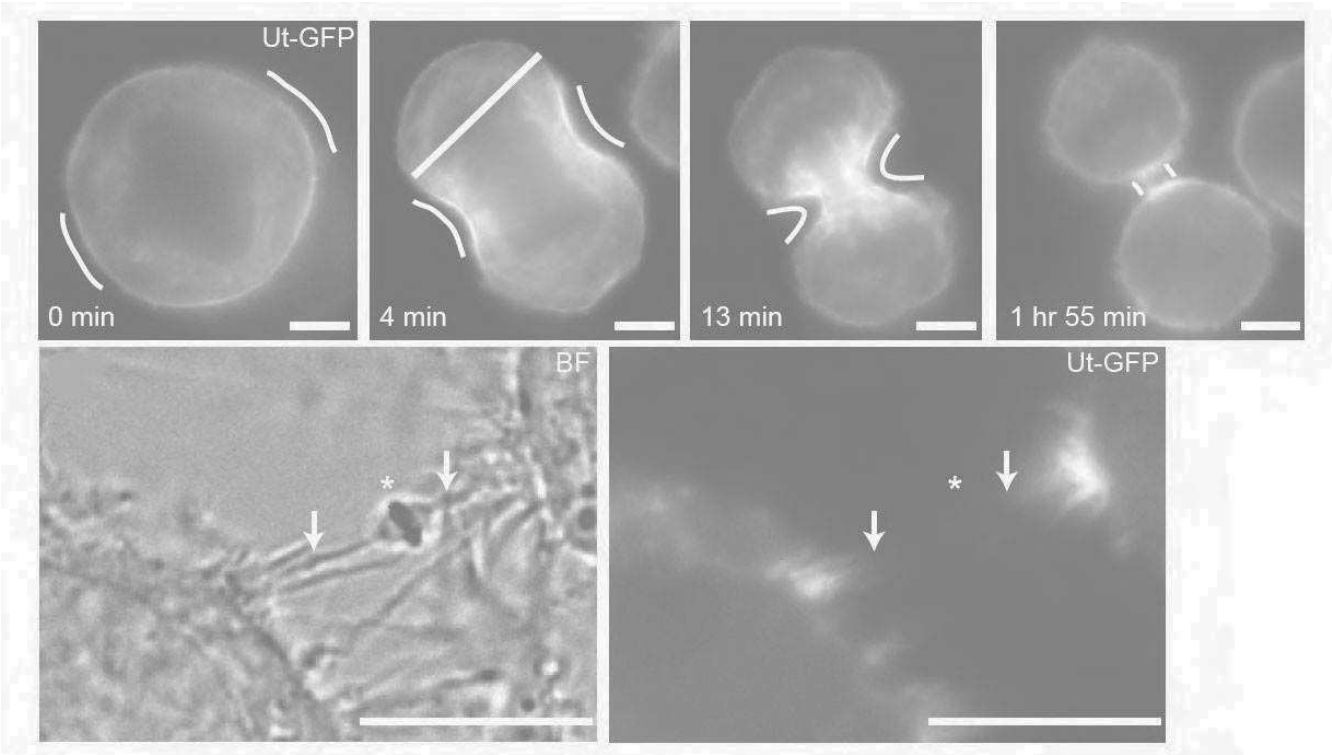
d'actomyosine, se retrouvent piégées dans un espace compris entre le réseau compact de microtubules et le cortex cellulaire, le renflement (figure 10c). C'est le cas des protéines du centralspindlin (MKLP1 et MgcRacGAP) ainsi que de leurs protéines partenaires Ect2, ARF6, CEP55 (Hutterer et al., 2009; Putsep et al., 1999; Zhao et al., 2006b). Cep55 est enrichie aux centrosomes et lors de l'entrée en mitose, sa phosphorylation sur un résidu sérine par plk1, lui permet d'être recrutée au midbody (Fabbro et al., 2005). ARF6 est une petite GTPase dont l'activité est essentielle pour la réalisation de la cytocinèse (Schweitzer and D'Souza-Schorey, 2005). Elle forme un complexe avec MKLP1 (Makyio et al., 2012) et serait recrutée via une interaction tripartite JSAP1-ARF6-Kinesin1 (Tuvshintugs et al., 2014). Les protéines Anilline, septines, citron kinase et Rho-A sont également enrichies au niveau du midbody (Gai et al., 2011; Hu et al., 2012; Kechad et al., 2012).

1.4.1.3. La membrane plasmique

La cytocinèse induit pour la cellule de très importants remodelages de la membrane en parallèle d'une augmentation de sa surface pour assurer la création des enveloppes des deux cellules filles (Balasubramanian et al., 2004). Ces besoins sont en parti couverts par l'apport de membrane néo-formée en provenance des sources de production de la cellule que sont les endosomes (Bluemink and de Laat, 1973; Emoto et al., 1996; Ng et al., 2005). L'apport de membrane est en outre essentiel durant l'étape finale de l'abscission pour permettre l'étanchéité des cellules filles lors de la rupture du pont (Schweitzer and D'Souza-Schorey, 2004).

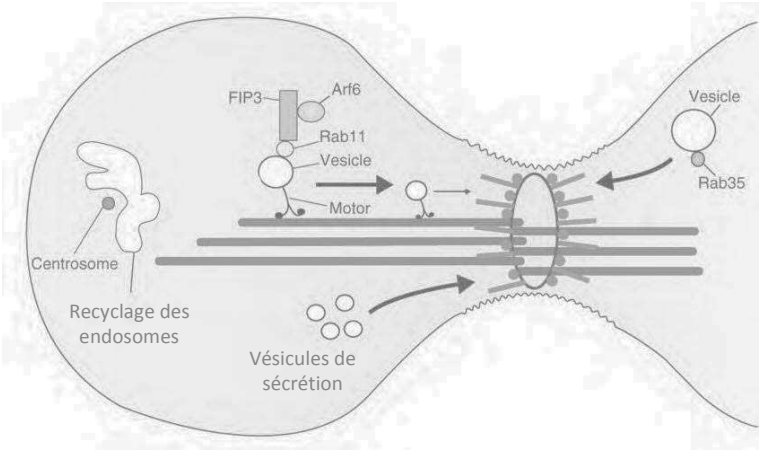
Les réorganisations membranaires durant la cytocinèse sont responsables de la relocalisation et de la concentration d'un composant de la membrane, le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PtdIns(4,5)P2). Il se localise de façon uniforme durant la metaphase/anaphase et se concentre au niveau du cortex du fuseau et du pont cellulaire durant la cytocinèse (Emoto et al., 2005; Field et al., 2005; Zhang et al., 2000). La localisation de PtdIns(4,5)P2 au midbody permet notamment le recrutement de complexes partenaires comme le complexe ERM (ezrin/radixin/moesin) (Carreno et al., 2008; Echard, 2008; Montagnac and Chavrier). Une forte concentration en PtdIns(4,5)P2 est également responsable de la modification de la dynamique du cytosquelette d'actine (Logan and Mandato, 2006). (pour une revue récente voir (Cauvin and Echard, 2014)). La présence de domaines membranaires riches en cholestérol est également nécessaire pour l'activation de

a



Contraste de phase Actine

b



<u>Figure 11</u> : La cytocinèse : le pont intercellulaire (2)
a- Dynamique de l'actine durant la cytocinèse. *D'après Schiel JA et al, Nat Cell Biol, 2012 (figures supplémentaires).*
b- Schématisation de trafic vésiculaire en direction du pont intercellulaire. *Adapté d'après Prekerys R. et al., J Cell Science, 2008.*

molécules de signalisation comme par exemple les protéines tyrosines kinases de la famille des Src kinases (Kasahara et al., 2007; Ng et al., 2005).

1.4.1.4. L'actine

Le contrôle de la temporalité de la polymérisation/dépolymérisation de l'actine est capital (figure 11a). En effet la rigidité corticale nécessaire pendant la formation de l'anneau de clivage et son invagination n'est plus nécessaire lors de la maturation du pont. Au contraire, la persistance d'actine au niveau du pont s'avère délétère à la finalisation de la cytocinèse. Par l'utilisation de faibles doses de drogues dépolymérisantes pour l'actine (LatrunculineA), une équipe a pu corriger les défauts d'abscission observés dans une lignée cellulaire issue de patients atteints de la maladie de Lowe et qui ont la particularité de présenter une persistance anormale de l'actine filamenteuse dans le pont intercellulaire (Dambournet et al., 2011). Cette même équipe avait déjà décrit qu'une dépolymérisation trop précoce de l'actine, avant l'invagination du pont intercellulaire, déstabilise le pont et engendre des défauts d'abscission (Echard et al., 2004).
Au niveau des interactions moléculaires, durant la maturation du pont intercellulaire la kinase PKCepsilon et la protéine 14-3-3 inactivent Rho-A (Saurin et al., 2008). L'actine filamenteuse qui participe à la contraction de l'anneau de clivage est alors dégradée en actine globulaire lorsque l'invagination du pont intercellulaire est à son terme (Guizetti et al., 2011). L'actine filamenteuse est également dépolymérisée par la présence d'une autre protéine p50RhoGAP (ARHGAP1) via CDC42 (Schiel et al., 2012).

1.4.1.5. Les protéines du trafic vésiculaire

La possibilité d'un rôle du trafic vésiculaire dans la maturation du pont a émergée dès l'identification du positionnement du Golgi et des endosomes qui se retrouvent regroupés aux extrémités du pont intercellulaire en télophase (Gaietta et al., 2006; Hehnly and Doxsey, 2012; Mullins and Biesele, 1977). Ils représentent un réservoir de proximité pour le trafic en direction du pont (figure 11b). Plusieurs études réalisées chez C. elegans, la levure fissipare et certaines lignées de cellules humaines ont initialement décrit qu'un blocage de la maturation des vésicules post-Golgi par un composé chimique (BrefeldinA) empêche la cytocinèse d'aboutir (Gromley et al., 2005; Liu et al., 2002a; Skop et al., 2001). Quelques auteurs n'ont pas confirmé cette hypothèse, en utilisant pourtant le même inhibiteur, mais

L'exocytose permet le transport des vésicules du Golgi vers la membrane plasmique où elles fusionnent pour permettre l'apport de molécules (transport cargo) et l'apport de membrane néo-formée. La fusion de ces vésicules avec la membrane est facilitée par les protéines SNARE présentes à la fois sur les vésicules (v-SNARE) et la membrane plasmique (t-SNARE). Un complexe macromoléculaire appelé exocyst est lui responsable de l'ancrage des vésicules à la membrane. La plupart des sous-unités qui composent l'octamère Exocyst ont été détectées au niveau du midbody (Murthy et al., 2005; Skop et al., 2004) et toutes ces sous unités sont nécessaires à la réalisation de l'abscission. En effet, l'invalidation séquentielle par interférence ARN dans des cellules HeLa, de chacune d'entre elles, induit une augmentation de la fréquence de cellules binucléées caractéristiques de défauts dans l'achèvement de la cytocinèse (Neto et al., 2013).

De très nombreuses protéines associées aux vésicules de la famille des RabGTPases ont également été identifiées comme jouant un rôle dans la cytocinèse (figure 11b), notamment dans une étude de crible par interférence ARN en cellules S2 (Kouranti et al., 2006). Deux d'entre elles, Rab11 et Rab35, induisent des défauts de cytocinèse sévères.

La GTPase Rab35 se localise à la membrane plasmique, régule un recyclage endosomal rapide et est responsable de la localisation et de la maintenance de PtdIns(4,5)P2 et de la GTPase SEPT2 (septine-2) (Kouranti et al., 2006).

La GTPase Rab11 s'accumule près de l'anneau de clivage puis dans le midbody (Horgan et al., 2004). Rab11 interagit avec deux des ces effecteurs, Rab11-FIP3 (FIP3) et à un degré moindre Rab11-FIP4 (FIP4) afin d'assurer le trafic vésiculaire (Giansanti et al., 2007; Pelissier et al., 2003; Wilson et al., 2005). FIP3 et FIP4 interagissent avec une autre GTPase associée aux endosomes, Arf6 (ADP rybosilation factor-6) (Wilson et al., 2005). La surexpression d'un mutant constitutivement actif d'Arf6 (ARF6 Q67L) augmente le recrutement de FIP3 et FIP4 au midbody, alors qu'un mutant constitutivement inactif (Arf6 T27N) empêche leur recrutement (Fielding et al., 2005). Le recrutement de FIP3 au midbody serait également possible via l'interaction avec le complexe centralspindlin (Simon and Prekeris, 2008). FIP3 peut fixer centralspindlin sur un site de fixation commun à Ect2. En fin de télophase Ect2 se dissocie de centralspindlin pour être relocalisée vers les noyaux, son absence sur centralspindlin permettant à FIP3 de s'y fixer (Simon et al., 2008).

a

modules	mammifères	levure fissipare	levure à bourgeon
ESCRT-0	HRS	Sst4 (Vps27)	Vps27
	STAM1/2	Hse1	Hse1
ESCRT-I	TSG101	Sst6 (Vps23)	Stp22
	Vps28	Vps28	Vps28
	Vps37A, Vps37B, Vps37C	Vps37	Vps37
	MVB12A, MVB12B		Mvb12
ESCRT-II	EAP30	Dot2 (Vps22)	Snf8
	EAP20	Vps25	Vps25
	EAP45	Vps36	Vps36
ESCRT-III	CHMP2A, CHMP2B	Vps2 (Did4)	Did4
	CHMP3	Vps24	Vps24
	CHMP4A, CHMP4B, CHMP4C	Vps32 (Snf7)	Snf7
	CHMP6	Vps20	Vps20
Vps4	Vps4A, Vps4B	Vps4	Vps4
	CHMP5	SPCC162.06c	Vps60
	Vta1	Vta1	Vta1

b

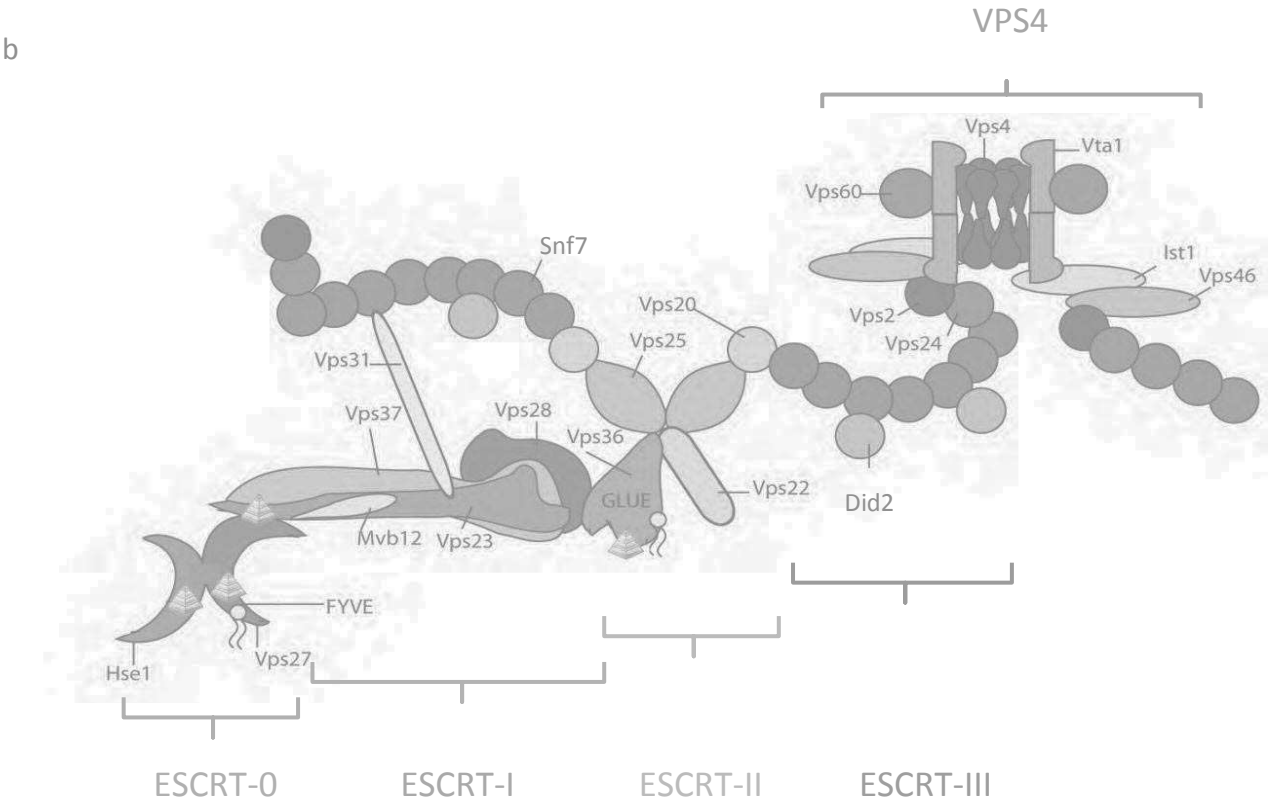


Figure 12 : Assemblage de la machinerie ESCRT

a- Orthologues des molécules ESCRT dans différents organismes. *Adapté d'après Bhutta MS. et al, Int J Mol Sci, 2014*

b- Composition et assemblage du complexe ESCRT. *Adapté d'après Herman EK. et al., J Cell Science, 2011*

Enfin, une ubiquitin ligase, la protéine BRUCE (Apollon ou BIRC6) a également été identifié comme régulateur du transport vésiculaire. Durant la cytocinèse BRUCE migre du système vésiculaire vers le midbody où elle sert de plateforme à l'ubiquitylation des protéines indésirables au point d'abscission (Pohl and Jentsch, 2008a; Pohl and Jentsch, 2008b).

1.4.1.6. Les ESCRT

Les composants du système ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) ont initialement été identifiés chez la levure comme faisant partie de la famille des protéines de type *vps* (vacuolar protein sorting) mutantes et qui ne peuvent donc pas transporter de protéines à l'intérieur de la vacuole (l'équivalent des lysosomes chez la levure) (Raymond et al., 1992). Chez les eucaryotes, les composants du système ESCRT sont au nombre de 5 complexes distincts; ESCRT-0, -I, -II, -III et Vps4 (figure 12) avec chacun un rôle précis dans le fonctionnement de cette machinerie. Les complexes ECSRT sont impliqués dans l'interaction avec les protéines membranaires ubiquitinées, la déformation de la membrane plasmique et l'abscission. Le mécanisme de bourgeonnement membranaire qu'ils permettent est d'ailleurs détourné par certains rétrovirus comme celui du VIH pour assurer sa propre réplication (Bleck et al., 2014; Martin-Serrano et al., 2003) (pour une revue récente sur les rétrovirus et ESCRT voir (Votteler and Sundquist, 2013)).

ESCRT-0 est le premier complexe de la machinerie ESCRT qui se localise sur les endosomes via une interaction avec les phospholipides PIP3. ESCRT-0 est un hétérodimère (1 :1) antiparallèle de sous unité Hrs et STAM 1,2. Une fois sur les endosomes ESCRT-0 peut alors fixer des protéines ubiquitinées. ESCRT-0 est responsable du recrutement du complexe ESCRT-I (Ren and Hurley, 2011).

ESCRT-I est un hétérotétramère (1 :1 :1 :1) des sous unités TSG101, Vps28, Vps37 et Mvb12. TSG101 est responsable de l'interaction avec ESCRT-0, les protéines ubiquitinées et les glycosaminoglycans des protéines virales (Ren and Hurley, 2011). TSG101 est recruté au niveau du midbody par interaction directe avec CEP55 et ALIX une protéine adaptatrice (Morita et al., 2007) (Okumura et al., 2013). Vps28 est responsable de l'interaction avec le complexe ESCRT-II et plus particulièrement la sous unité EAP45 (Teo et al., 2006).

ESCRT-II est également un hétérotétramère (1 :1 :2) composé des sous unités EAP45, EAP30 - qui interagissent entre elles - et de deux sous unité vps25 interagissant individuellement avec EAP45 et EAP30, lui conférant une structure en forme de Y. Un

domaine particulier de EAP45, baptisé GLUE (Gram Like Ubiquitin Binding in EAP45), présent à la base du Y fonctionne comme une plateforme pour l'ancrage avec ESCRT-I et peut simultanément fixer PIP3 et l'ubiquitine (Im and Hurley, 2008; Slagsvold et al., 2005; Teo et al., 2006). Une fois les protéines collectées ESCRT-I et ESCRT-II peuvent initier le bourgeonnement de la membrane des endosomes.

ESCRT-III se compose de 4 sous unités principales dont la stoichiometrie de chacune n'est pas encore précisément défini : CHMP6, CHMP4, CHMP3, CHMP2 auxquelles s'ajoutent trois sous unités accessoires : CHMP1, CHMP5 and Ist1 (Saksena et al., 2009). La partie carboxy-terminale des sous unités centrales du complexe ESCRT-III possèdent un domaine d'interaction avec les microtubules et un domaine d'interaction avec Vps4 (Scott et al., 2005; Shestakova et al., 2013).

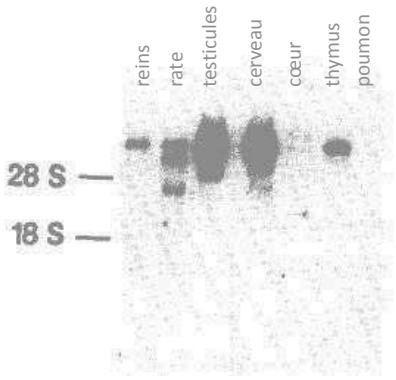
Le complexe Vps4 est en réalité l'assemblage de Vps4 et de son cofacteur VtaI. Sous sa forme cytoplamsique Vps4 est inactif et la fixation de Vta1 va aboutir à un complexe actif. Vps4 est une méchano-enzyme de type AAA-Atpase qui convertit l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP en activité mécanique (Davies et al., 2014; Yang and Hurley, 2010). Le complexe Vps4 n'est pas un mécanisme d'assemblage des endosomes. Au contraire, il désassemble les filaments d'ESCRT-III pour permettre leur recyclage vers le cytoplasme (Adell et al., 2014; Yang and Hurley, 2010).

La démonstration du rôle des ESCRT dans la cytocinèse est relativement récente (Carlton and Martin-Serrano, 2007; Spitzer et al., 2006). Cependant les études de ce mécanisme abondent depuis et sa machinerie est largement disséquée aujourd'hui. De plus les travaux réalisés sur le rôle des ESCRT dans la formation des vésicules et les bourgeonnements membranaires des rétro-virus permettent d'accélérer la compréhension du rôle des ESCRT dans la cytocinèse. Malgré tout, trois modèles distincts sont proposés actuellement pour illustrer le rôle de la machinerie ESCRT dans l'abscission (pour des revues récentes voir (Bhutta et al., 2014; Echard, 2012; Mierzwa and Gerlich, 2014)). J'aborde le rôle des ESCRT dans la résorption du pont intercellulaire au cours du mécanisme d'abscission dans le chapitre 1.5 : la coupure du pont.

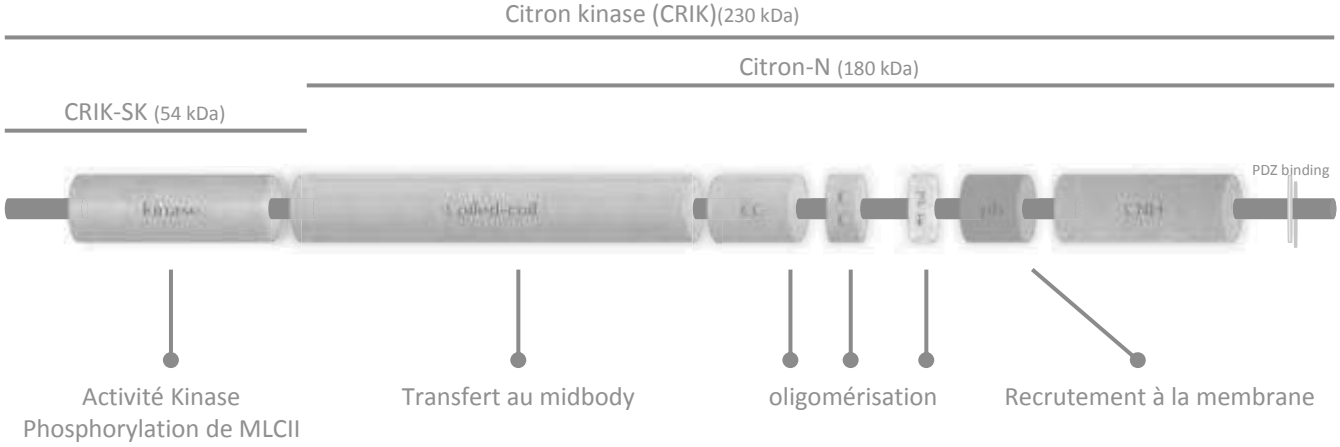
1.4.2. La protéine Citron kinase

Citron kinase a été identifié au milieu des années 1990 par la technologie double-hybride chez la levure comme un effecteur potentiel de la voie Rho/Rac qui interagit avec la forme

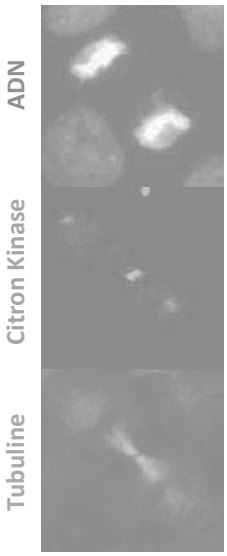
a



b



c



d

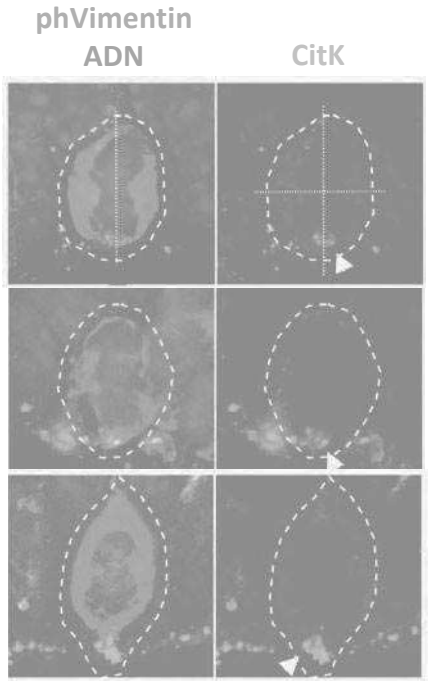


Figure 13 : Citron kinase (CitK)

a- Distribution tissulaire des ARNms de Citron. *Adapté d'après Madaule P. et al., FEBS letters, 1995*

b- Représentation graphique des principales isoformes de Citron, des domaines protéiques et des principales fonctions associées

c- Localisation au midbody de Citron kinase durant la cytocinèse dans des cellules HeLa. *Images personnelles.*

d- Exemples de polarisation apicale de CitK dans des cellules souches neurales en métaphase au niveau de la zone ventriculaire du neocortex murin. *Adapté d'après Chang YO, Cell Cycle, 2010*

active, fixée au GTP, de ces deux protéines (Madaule et al., 1995). Son ARN messager a été identifié par les mêmes auteurs massivement exprimé dans le cerveau et les testicules et plus discrètement dans la rate, les reins, le thymus, le cœur et les poumons, chez la souris (figure 13a). Depuis la présence de Citron dans les cardiomyocytes a été confirmée mais restreinte aux stades embryonnaires et périnataux (Ahuja et al., 2007). Quelques années plus tard, cette même équipe a proposé un rôle pour Citron dans la division cellulaire et plus spécifiquement la cytocinèse, notamment par son enrichissement au niveau du midbody dans des cellules HeLa (Madaule et al., 1998). L'utilisation de cribles RNAi réalisés sur des cellules S2 de Drosophile a définitivement identifié Citron kinase (Sticky chez la Drosophile) comme un acteur majeur de la réalisation de la cytocinèse (D'Avino et al., 2004; Echard et al., 2004; Kiger et al., 2003). Les cellules déplétées en protéine Citron kinase présentent un phénotype de multinucléation sévère, des retards d'abscission ainsi qu'un défaut d'organisation du pont intercellulaire (D'Avino et al., 2004; Naim et al., 2004).

Citron Kinase est une protéine sérine thréonine kinase qui peut être produite au minimum sous deux isoformes : une protéine de 240 kDa (CRIK, Citron Kinase Rho Interacting protein) dans laquelle le domaine tyrosine kinase N-terminal est suivi par la séquence de la protéine Citron ; une isoforme de 180kDa qui consiste essentiellement en la protéine pleine taille dépourvue du domaine kinase (CRIK-SK, 54kDa) et généralement dénommée Citron-N (Di Cunto et al., 1998) (figure 13b). Les deux polypeptides CRIK et CRIK-SK sont capables *in vitro* de phosphoryler des cibles potentielles mais pour l'instant, la seule cible de Citron kinase identifiée *in vivo* serait la chaine régulatrice de la myosine (MLC2), sur sérine en position 19 et Thréonine en position 18 (Dean and Spudich, 2006; Yamashiro et al., 2003). L'activité kinase de Citron étant potentialisée par la co-expression de la protéine Rho constitutivement active, Citron kinase a longtemps été considéré comme un effecteur de la voie Rho, en aval de RhoA et ce jusqu'à très récemment (Ahmed et al., 2011; Di Cunto et al., 1998) (pour une revue sur les effecteurs de la voie Rho chez les mammifères voir (Thumkeo et al., 2013)). Depuis, deux équipes ont simultanément proposé que Citron kinase (sticky précisément) ne soit pas un effecteur canonique de la voie Rho mais qu'il serait responsable de la localisation et du maintien de RhoA et Anilline au niveau du midbody (Bassi et al., 2011; Gai et al., 2011). Les dernières études réalisées sur Citron, majoritairement chez la Drosophile, ont démontrées que le domaine coiled-coil de Citron est responsable de la localisation de RhoA et Anilline au midbody, permet la transition de la constriction membranaire vers l'abscission et serait responsable de la stabilité du pont intercellulaire (Bassi et al., 2013; Bassi et al., 2011; El Amine et al., 2013; Gai et al., 2011; Serres et al., 2012; Watanabe et al., 2013). Dans des cellules HeLa, Citron interagit également avec la kinesine KIF14 et ces protéines assurent

mutuellement leur localisation au midbody (figure 13c). Citron Kinase interagit ainsi avec tout le complexe du fuseau central (PRC1, MKLP1, MKLP2, KIF4 et KIF14) responsable de la stabilité du fuseau et du pont intercelluaire (Gruneberg et al., 2006). Chez la souris, l'animal déficient pour Citron kinase présente une apoptose massive des progéniteurs neuraux lors du développement cérébral conduisant à une microcéphalie corticale et des neurones multinucléés (Di Cunto et al., 2000). Au niveau testiculaire, les souris mâles déficients pour Citron présentent également une polyploïdie des spermatogonies et une forte mortalité cellulaire (Cunto et al., 2002). Chez le rat, une délétion dans l'exon 1 de Citron conduit à un phénotype similaire à celui de la souris, avec des défauts d'abscission des progéniteurs neuraux, une apoptose massive et une réduction drastique du cortex cérébral (Anastas et al., 2011; Sarkisian et al., 2002).

Citron kinase est impliqué dans des mécanismes autres que la cytocinèse. Sa localisation est extrêmement polarisée dans les progéniteurs neuraux en division avec une restriction à la surface ventriculaire du neuroépithélium (figure 13d). Cette polarisation est notamment permise par l'interaction avec la protéine DLG5 (Disc Large 5) (Chang et al., 2010). Citron-N est impliquée dans l'organisation du Golgi et le contrôle de la maintenance des épines dendritiques des neurones primaires (Camera et al., 2003; Camera et al., 2008). Les épines dendritiques sont capitales dans la plasticité synaptique et l'efficience de la mémoire. Une étude a identifiée chez la souris un interacteur de Citron, p140Cap, capable à la fois de fixer Citron-N et d'inhiber directement l'activité de la kinase Src (Repetto et al., 2014). p140Cap, Citron et Src sont détectées dans un même complexe par co-immunoprécipitation d'extraits totaux de cerveaux et de fractions synaptiques. De plus Citron-N est sur-représenté dans les neurones post-mitotiques (Di Cunto et al., 2000). Il est également capable d'interagir avec PSD-95, une protéine postsynaptique (Furuyashiki et al., 1999). Si l'interaction entre PSD-95 et Citron n'a pour l'instant pas été complètement élucidée sur le plan fonctionnel plusieurs études impliquent la protéine Citron dans des pathologies mentales et des pathologies touchant les cellules gliales (Comabella et al., 2009; Lyons-Warren et al., 2005; Nicodemus et al., 2010). Citron kinase serait également capable d'interagir avec les ESCRT et peut par exemple perturber la production de particule virales du VIH (Ding et al., 2011).

D'un point de vue physiopathologique, Citron est surexprimé dans certains types de cancers et apparait donc comme un candidat potentiel dans la lutte contre la tumorigénèse (Fu et al., 2011). Une étude *in vivo* chez la souris a démontrée qu'il était possible de réduire l'incidence de cancers hépatiques en ciblant Citron kinase par ARN interférence (Fu et al., 2011). En induisant des défauts d'abscission, Citron participe à la génération et la présence de cellules aneuploïdes dans un tissu sain. L'instabilité génétique de ces cellules aneuploïdes

est aujourd'hui reconnue comme un terreau favorable à l'apparition de tumeurs (pour une revue récente lire (Pikor et al., 2013)). Citron kinase est également ré-exprimé dans un contexte pathologique non cancéreux, les hypertrophies cardiaques chez l'adulte, sans que toutefois les cellules ne parviennent à se diviser de nouveau (Ahuja et al., 2007).
Concernant sa structure, l'isoforme la plus longue de la protéine Citron kinase compte 2070 acides aminés chez la souris et 2027 acides aminés chez l'humain, assemblés en 5 domaines majeurs pour une masse d'environ 230kDa (voir figure 13b). Son orthologue Sticky chez la Drosophile compte 1854 acides aminés et une masse d'environ 211kDa. L'homologie de domaines est relativement forte entre ces trois espèces ce qui renforce la contribution de chaque modèle à la compréhension générales des fonctions de Citron kinase.

1.4.3. La stabilité du pont

Les cellules filles sont connectées durant toute la durée de la cytocinèse par un pont intercellulaire jusqu'à l'étape de dissociation finale, l'abscission (Echard et al., 2004). De l'initiation du clivage équatorial en Anaphase tardive à la formation complète du pont, la stabilité de la structure naissante est assurée principalement par le cytosquelette d'actine. Au cours de la maturation du pont et, consécutivement à la décroissance de l'activité de RhoA, cette actine est dépolymérisée et la stabilité du pont doit donc faire appel à d'autres mécanismes (figure 14) (Dambournet et al., 2011). Or, l'ancrage du sillon de clivage doit absolument être maintenu au cortex jusqu'à la séparation complète des cellules sœurs. Un relâchement au niveau du pont intercellulaire induit des défauts de ploïdie (figure 14).
L'enrichissement de la membrane en PtdIns(4,5)P2 au niveau du pont intercellulaire contribue à la stabilité du pont en fournissant des plateformes d'ancrage pour les protéines qui contiennent un domaine PH (Plecstrin Homology). L'expression d'un dominant négatif de Rab35, inhibe la localisation du PtdIns(4,5)P2 au pont intercellulaire et empêche le bon ancrage du sillon (Kouranti et al., 2006). Centralspindlin stabilise le pont par la liaison de MgcRacGap et MKLP1 avec les phosphatidylinositols membranaires (Lekomtsev et al., 2012). MKLP1 participe également à la formation de tétramères avec la GTPase ARF6, ancrée à la membrane (Makyio et al., 2012) et qui inhibe l'action délétère de la protéine 14-3-3 sur centralspindlin (Joseph et al., 2012). Citron kinase est aussi capable de fixer MKLP1 pour former un supra complexe avec PRC1 et KIF14 d'un côté pour assurer l'ancrage aux microtubules (Bassi et al., 2013; Gruneberg et al., 2006; Watanabe et al., 2013) et d'un autre

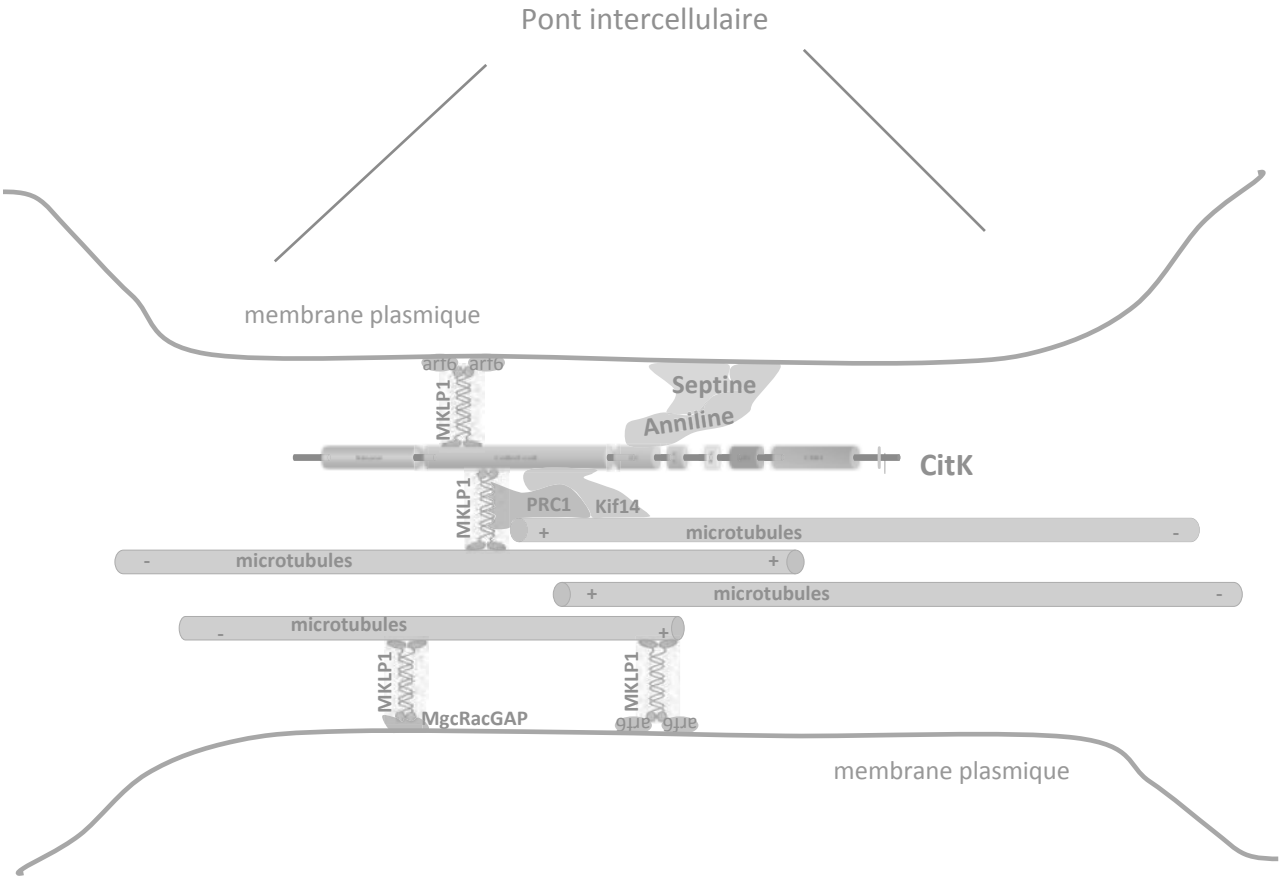


Figure 14 : La stabilité du pont intercellulaire
Voir texte pour détails

côté citron kinase est capable de lier Anilline, pour assurer l'ancrage à la membrane plasmique via les PtdIns(4,5)P2 (Liu et al., 2012) et sa liaison avec septine (Kechad et al., 2012). Citron kinase est une protéine clé de la stabilité du pont. Son absence induit des défauts d'abscission par réouverture du pont intercellulaire engendrant la multinucléation des cellules *in vitro* et *in vivo*, chez les mammifères et les insectes (Anastas et al., 2011; Bassi et al., 2013; Echard et al., 2004; Gai et al., 2011; Naim et al., 2004; Watanabe et al., 2013).
Afin de prévenir toute réalisation trop précoce de l'abscission, avant que la répartition équitable entre les cellules filles du matériel génomique soit achevée, il existe plusieurs mécanismes de surveillance, dont le SAC qui reconnait le bon attachement des chromosomes au fuseau central et retarde la progression de l'anaphase (voir paragraphe 1.2.4). Cependant ces points de contrôles peuvent être contournés et les erreurs de ségrégation des chromosomes persistantes au delà de l'anaphase seraient présentes dans environ 1% des cellules somatiques en division (Cimini et al., 2001). Il existe alors un mécanisme capable de retarder le déclenchement de l'abscission losrque des molécules d'ADN libres sont présentes au sein du pont intercellulaire. Il a été découvert chez la levure *Saccharomyces Cerevisiae* et baptisé NoCut (Norden et al., 2006). Chez les mammifères ce serait le complexe CPC qui assurerait ce rôle. Une des sous unités du complexe CPC, Boréaline, est capable de lier directement Snf7, une des sous unités du complexe ESCRT-III. AuroraB, l'unité catalytique du CPC phosphoryle directement Snf7, maintenu dans son environnement proche par Boréaline. La rétention et la phosphorylation de Snf7 empêche la polymérisation du complexe ESCRT-III et son association à la membrane (Capalbo et al., 2012). La présence d'AuroraB au midbody lors de la cytocinèse (Ruchaud et al., 2007) empêche également la complétion de l'abscision en phosphorylant MKLP1 tant que de la chromatine libre est présente au sein du pont inter-cellulaire (Steigemann et al., 2009)

1.5. La coupure du pont : l'abscission

Le pont intercellulaire peut persister pendant plusieurs heures, voire jusqu'en G2 du cycle cellulaire suivant (Schulze and Blose, 1984). D'ailleurs une étude récente propose de considérer l'abscission comme un évènement à part entière de la phase G1 du cycle suivant. Les auteurs ont en effet démontré à l'aide d'un marqueur de la phase G1 (Cdt1) que l'abscission se réalise dans près de 90% des cas en présence de l'expression de ce marqueur (Gershony et al., 2014). Une seconde étude combinant analyse expérimentale et modèlisation a estimé la persistance théorique du pont intercellulaire dans des cellules HeLa

à environ 3,4 heures et mesurée une durée expérimentale de 3,8 heures (Crowell et al., 2013).

L'étude de l'abscission est relativement récente, notamment car elle nécessite des techniques d'imagerie avancées. Les progrès dans l'utilisation des protéines fluorescentes, de la vidéomicroscopie et de l'ultra résolution ont permis de réaliser les expérimentations permettant de mieux comprendre ce mécanisme. Ces progrès n'ont cependant pas résolus tous les questionnements sur l'abscission. Pour preuve, 3 modèles distincts d'abscission sont toujours d'actualité.

1.5.1. Les différents modèles d'abscission

Aujourd'hui 3 modèles sont proposés pour illustrer l'abscission : un modèle basé sur la rupture physique du pont suivi d'une réparation des extrémités béantes, un modèle basé sur l'apport massif de membrane néoformée depuis le Golgi sur le site d'abscission, et un modèle qui propose que le pincement extrême du pont intercellulaire en un point unique permettrait la fusion des membranes néo-adjacentes (figure 15 a).

Le modèle de **cassure mécanique** du pont a été initialement proposé suite à des mesures des forces de tensions exercées sur une cellule en division, l'augmentation des forces détectées sur la cellule allant de pair avec sa progression vers l'abscision (Burton and Taylor, 1997). Il est soutenu par quelques études (Kanada et al., 2005; LaFlamme et al., 2008) et notamment une étude qui propose que les mouvements migratoires divergents des cellules et les forces générées pourraient être responsable d'une rupture mécanique du pont (Bottcher et al., 2009). Cependant, ce modèle qui à ma connaissance n'a jamais été réellement démontré *in vitro* ou *in vivo*, est aujourd'hui peu crédible, notamment depuis que l'équipe de Matthieu Piel a élégamment proposé qu'un relâchement des forces de tension au pont intercellulaire soit nécéssaire à l'achèvement de l'abscission (Lafaurie-Janvore et al., 2013). En effet, s'il pouvait paraitre naturel pour séparer deux cellules filles d'étirer le pont intercellulaire jusqu'à ce qu'il se rompe, les auteurs ont démontrés que des forces de tensions exercées sur le pont intercellulaire retardent au contraire la séparation des cellules filles. Un relâchement de tension latérale permet le recrutement de la machinerie ESCRT-III puis la séparation des membranes. De plus, les cellules non adhérentes

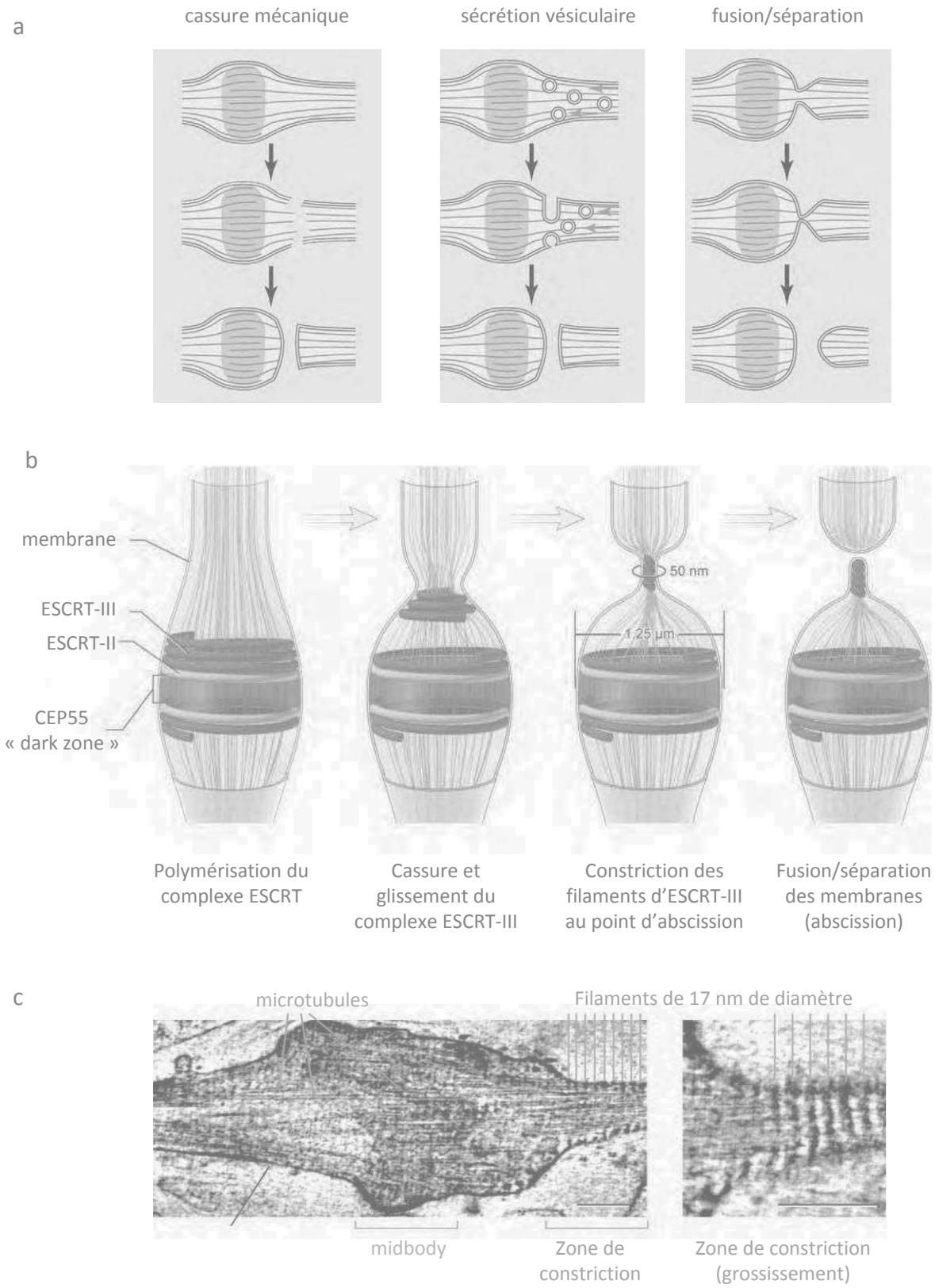


Figure 15 : l'abscission

a- Diffrérents modèles d'abscission du pont intercellulaire. *Adapté d'après Elia N. et al., Cell, 2013.*

b- Détails du modèle de fusion/séparation des membranes aboutissant à l'abscission. *D'après Elia N. et al., Biophys J, 2012*.

c- Electro-tomographie d'un pont intercellulaire durant l'abscission. Les filaments espacés de 17 nm de diamètre sont des filaments d'ESCRT-III enroulant les microtubules au point d'abscission. *Adapté d'après Fededa JP et al., Nat Cell Biol, 2012*

ou qui ne migrent pas l'une par rapport à l'autre se séparent également par abscission, sans être soumise à des forces de traction permises par une adhésion au support.

Le modèle de **sécrétion vésiculaire** est selon moi beaucoup plus plausible bien qu'il dérive majoritairement d'analogie avec les végétaux. En effet la sécrétion de vésicules dérivées du Golgi semble être le mécanisme prépondérant dans la séparation des cellules post-mitotiques des végétaux qui sont dépourvues de pouvoir contractile au niveau de leur membrane (pour un revue récente voir (Van Damme et al., 2008)). Cependant, à la différence des animaux, chez les plantes les cellules n'achèvent pas la cytocinèse par une abscission mais par l'apparition d'une structure médiane entre les cellules filles, le phragmoplaste, qui va croitre par l'apport vésiculaire constant jusqu'à former un mur étanche entre les deux cellules filles (Jurgens et al., 2015; Otegui et al., 2005). Le trafic vésiculaire est également d'importance chez les cellules animales jusqu'à des étapes tardives qui précède l'abscission (voir chapitre a5 : le trafic vésiculaire). Il n'est cependant pas encore clairement tranché si le trafic vésiculaire contribue directement à l'abscission par fusion des membranes ou bien s'il assure uniquement le transport des acteurs de l'abscission au site ad hoc.

Enfin, le dernier modèle qui semble soutenu par la littérature la plus dense et la plus récente est celui qui propose que la constriction membranaire extrême en un point du midbody permette le rapprochement et la **fusion/séparation** des membranes existantes (figure 15b) (Guizetti et al., 2011; Schiel et al., 2012).

Juste avant que l'abscission ne débute, la taille du pont intercellulaire se réduit de 1,5-2µm à 100-200nm de diamètre puis le recrutement d'une famille de protéines, les ESCRT, débute. La protéine centrosomale CEP55 recrute la sous unité TSG101 du complexe ESCRT-I et la protéine ALIX (Apoptosis-linked gene-2-interacting protein X) au midbody. A partir de ces complexes CEP55-TSG101 et CEP55-ALIX, le recrutement successif de tous les modules ESCRT-I, ESCRT-II et ESCRT-III va se poursuivre (voir supra paragraphe ESCRT) (Elia et al., 2011; Guizetti et al., 2011). ALIX régule la polymérisation d'ESCRT-III (Pires et al., 2009). ESCRT-III est aujourd'hui le module considéré comme acteur direct de l'abscission. En effet, la déplétion de la sous unité Vps2 du complexe ESCRT-III, empêche la formation des filaments de 17nm qui ont été décrits comme encerclant le pont intercellulaire juste avant l'abscission (figure 15c) (Guizetti et al., 2011). *In vitro* et *in vivo* ESCRT-III serait capable de former de manière autonome ces filaments de 17nm de diamètre encerclant le midbody (Henne et al., 2012). A partir de cette étape l'abscission est réalisée soit par une courbure initiée depuis le cœur du pont intercellulaire (Guizetti et al., 2011), soit par un glissement centrifuge de ces anneaux filamenteux à partir du midbody et impliquant le module Vps4

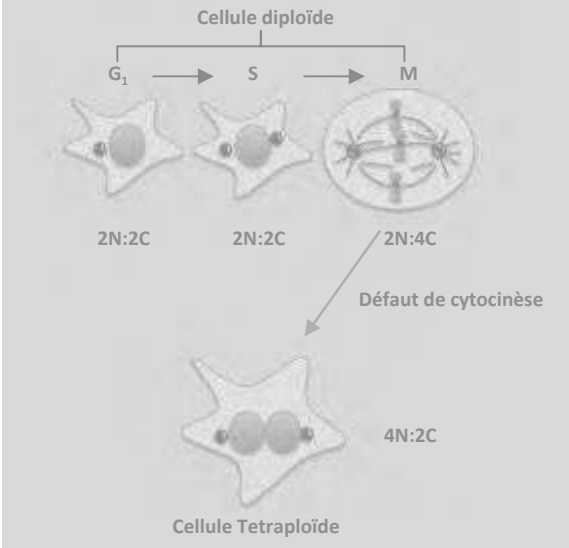
(Elia et al., 2012), soit par des mécanismes de déformations de la membrane autres, ESCRT-III ne servant que de stabilisateur local (Schiel et al., 2012). Dans tous les cas, les composants d'ESCRT-III se répartissent au cours de l'abscission en deux régions périphériques du midbody, l'une qui colocalise avec TGS101 au point de recrutement initial, la seconde, distant d'environ 1µm de la première, qui sera le site précis de clivage final (Elad et al., 2011; Elia et al., 2012; Guizetti et al., 2011).

1.5.2. La cytocinèse sans abscission

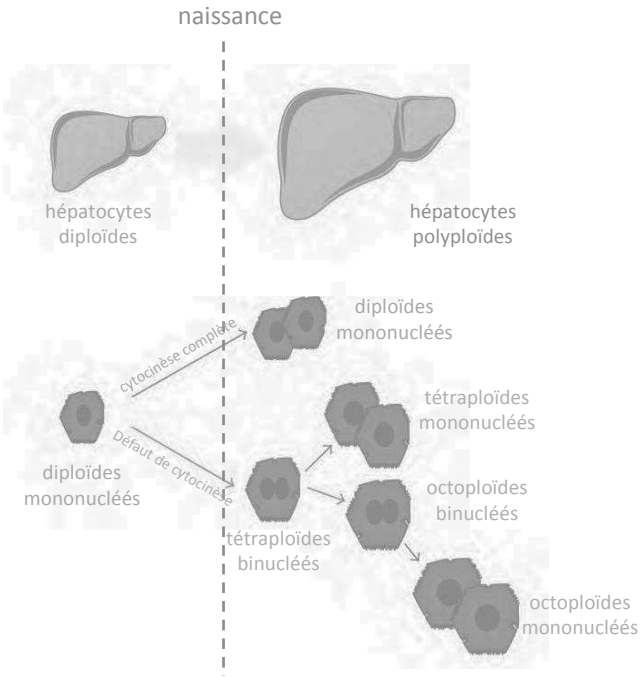
La diploïdie est la règle pour la majorité des cellules somatiques des mammifères, à l'exception du rat viscache roux d'argentine, tétraploïdes avec ces 102 chromosomes !! (Gallardo et al., 1999). Il existe cependant des cellules « naturellement » hypoploïdes ou hyperploïdes, on parle d'aneuploïdie physiologique. Les causes de cette aneuploïdie physiologique ne sont pas restreintes à des défauts dans le mécanisme d'abscision. L'aneuploïdie peut être générée notamment par une endo-reduplication des chromosomes ou une fusion cellulaire (pour une revue voir (Davoli and de Lange, 2011)). J'aborde dans les lignes suivantes quelques exemples de cellules physiologiquement aneuploïdes pour lesquelles un défaut de cytocinèse a été démontrée (figure 16a) (pour une revue récente voir (Lacroix and Maddox, 2012)):

Chez le rat adulte, 70% des cellules du foie, les **hépatocytes**, sont tétraploïdes, 15 à 20 % sont octoploïdes et seulement 10 à 15% diploïdes (Seglen, 1997). Chez l'homme la polyploïdie des hépatocytes a été estimée jusqu'à près de 30% des cellules du tissu chez l'individu âgé (Kudryavtsev et al., 1993) et n'apparait qu'après la naissance (figure 16b) (Celton-Morizur et al., 2009). La diploïdie des hépatocytes est corrélée avec leur capacité de prolifération et les cellules diploïdes pourraient constituer un réservoir de cellules progénitrices. Il a été démontré que les cellules polyploïdes ne sont pas mobilisées pour la régénération du tissu après une hépatectomie chez le rat et les cellules qui composent le tissu nouvellement apparu sont majoritairement diploïdes (Seglen, 1997). De même chez l'homme la proportion d'hépatocytes tétraploïdes est faible jusqu'à 50 ans puis un pic d'accumulation apparait alors que les capacités régénératrices du foie diminuent (Kudryavtsev et al., 1993). Cette corrélation entre la ploïdie et la prolifération des hépatocytes est également confirmée par la dérégulation de la ploïdie dans les cancers du

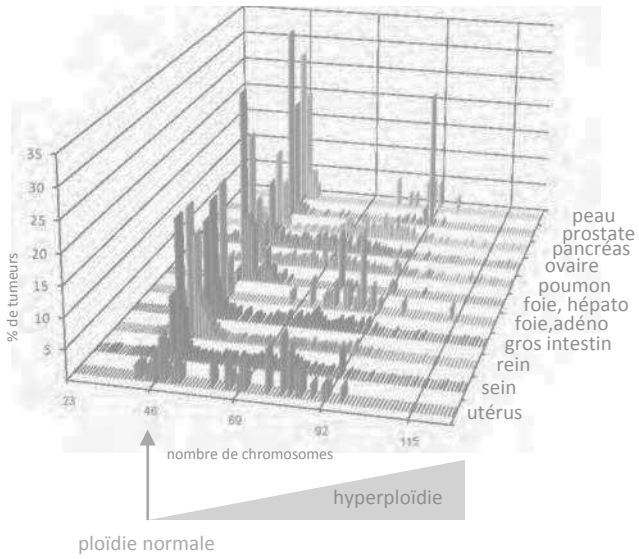
a



b



c



<u>Figure 16</u> : L'aneuploïdie

a- Schématisation de la tétraploïdie par défaut de cytocinèse. *Adapté d'après Ganem NJ et al., Cell, 2014*

b- Exemples d'aneuploïdie physiologique : cas des hépatocytes. *Adapté d'après Gentric G et al., International Journal of Hepatology, 2012*

c- Distribution du nombre de chromosomes dans les cancers les plus fréquents chez l'homme. *Adapté d'après Storchova Z. et al., J cell Science, 2008*

foie (Saeter et al., 1988). Dans les hépatocytes, la polyploïdie serait la conséquence d'un défaut d'activation de RhoA durant la cytocinèse entrainant l'absence de mouvement contractile de l'anneau de clivage (Celton-Morizur et al., 2009; Guidotti et al., 2003). L'apparition d'hépatocytes binucléés n'active pas les points de contrôles dépendants de P53 et les cellules doublent à nouveau leur contenu lors de la phase-S suivante aboutissant, après mitose, à deux hépatocytes tétraploïdes (Guidotti et al., 2003).

Chez la souris, près de 90% des cellules du myocarde sont tétraploïdes ou octoploïdes et chez l'homme cette proportion varie entre 25 à 85% (Brodsky et al., 1991). Chez l'homme, la division des cellules musculaires cardiaques, les **cardiomyocites**, est maximale autour des stades périnataux et semble quasiment éteinte après l'âge de 20 ans, période au-delà de laquelle la mitose et la cytocinèse ne sont plus détectables (Mollova et al., 2013). Une étude préliminaire chez le rat à démontrée que les cardiomyocites perdent leur capacité à achever la cytocinèse et que le défaut d'abscission est lié à des étapes postérieures à la formation de l'anneau contractile (Li et al., 1997). Récemment une régulation de la contractilité de l'anneau d'acto-myosine sous le contrôle de la voie Hippo a été proposée (Heallen et al., 2013) ainsi qu'un défaut d'enrichissement d'Anilline au point de clivage (Engel et al., 2006), tout comme l'inhibition de l'apoptose des cellules polyploïdes par surexpression de la cyclinG1, cible de P53 (Liu et al., 2010).

La **lignée germinale** des mammifères et de certains insectes est également soumise à des défauts d'abscission. L'originalité des défauts d'abscission physiologique dans la lignée germinale est que les cellules filles générées ne sont pas tétraploïdes. Tout d'abord, le défaut d'abscision apparait après la meïose qui est un mécanisme de réduction de la ploïdie. Ensuite le but de cette absence d'abscission est de maintenir entre les cellules germinales des ponts intercellulaires d'un diamètre voisin de 1µm (Braun et al., 1989; Dym and Fawcett, 1971; Fawcett et al., 1959). Ces ponts serviraient à la diffusion de molécules au sein du même syncitium et à la synchronisation des cellules qui le composent (Greenbaum et al., 2007) (Braun et al., 1989).
Ce maintien du pont intercellulaire entre les cellules germinales est majoritairement attribué à l'abondance d'une protéine identifiée comme spécifiquement exprimée dans ces cellules, la protéine TEX-14 (Greenbaum et al., 2006; Wu et al., 2003). Les souris mâles déficientes pour TEX-14 sont stériles par absence de pont intercellulaire entre les spermatogonies (Greenbaum et al., 2009). Depuis l'expression de TEX-14 a été élargie à d'autres types cellulaires de l'organisme et TEX-14 est exprimée dans les cellules HeLa (Mondal et al.,

2014). L'activité de TEX-14 peut d'ailleurs être contrôlée par polo-kinase durant la cytocinèse (Mondal et al., 2014). TEX-14 bloque la réalisation de l'abscission dans les cellules non germinales par compétition avec CEP55 dans l'interaction avec ALIX et TSG101 au niveau de l'anneau de clivage (Greenbaum et al., 2011).
Chez les invertébrés la lignée germinale est également soumise à une division cellulaire sans abscission. L'ovogénèse de la Drosophile se réalise par 4 cycles de division asymétriques successives suivi d'une cytocinèse incomplète aboutissant à un syncitium de 16 cellules issues du même progéniteur. L'orthologue de CLASP (orbit) a été identifié comme régulateur de cette abscision inachevée (Mathe et al., 2003). Son rôle a également été confirmé dans la cytocinèse incomplète lors de la gamétogénèse chez le mâle Drosophile (Kitazawa et al., 2014; Miyauchi et al., 2013). L'orthologue de CIN85 (Cindr), Anilline et Pavarotti (MKLP1) ont également été impliqués (Carmena et al., 1998; Eikenes et al., 2013; Hime et al., 1996).

Le cerveau des mammifères est également concerné par l'aneuploïdie physiologique et chez la souris près de 33% des **cellules souches neurales** seraient aneuploïdes à 13 jours de développement *in utero*, peu après le début de la neurogénèse (Rehen et al., 2001). Cette aneuploïdie persiste au-delà de la vague apoptotique de sélection des neurones et l'on retrouve autour de 3% de neurones tétraploïdes chez la souris au-delà de 12 jours après la naissance (Di Cunto et al., 2000; Lopez-Sanchez and Frade, 2013). Chez l'embryon humain cette aneuploïdie pourrait atteindre jusqu'à 35% des cellules neurales (Yurov et al., 2007). Il a été décrit chez la souris par des techniques de transport rétrograde que ces neurones aneuploïdes étaient parfaitement connectés dans le circuit neuronal (Kingsbury et al., 2005). De plus certaines populations de neurones comme les neurones de Purkinje, sont fortement tétraploïdes, même si la démonstration de leur ploïdie fait encore aujourd'hui débat (Frade, 2010). La variation de l'aneuploïdie physiologique est associée chez l'homme à des pathologies du système nerveux central. Les patients atteints de schizophrénie auraient une prévalence d'une faible aneuploïdie (Yurov et al., 2008) alors que celle-ci augmenterait chez les patients souffrant de la maladie d'Alzheimer (Iourov et al., 2009a). A ma connaissance seules deux études ont à ce jour proposées des cascades moléculaires participant au contrôle de la ploïdie des neuroblastes chez la souris, l'une impliquant la protéine p75ntr (Lopez-Sanchez and Frade, 2013), ayant un rôle dans le cycle cellulaire, la seconde impliquant la protéine Citron kinase, acteur majeur de la cytocinèse (Di Cunto et al., 2000).

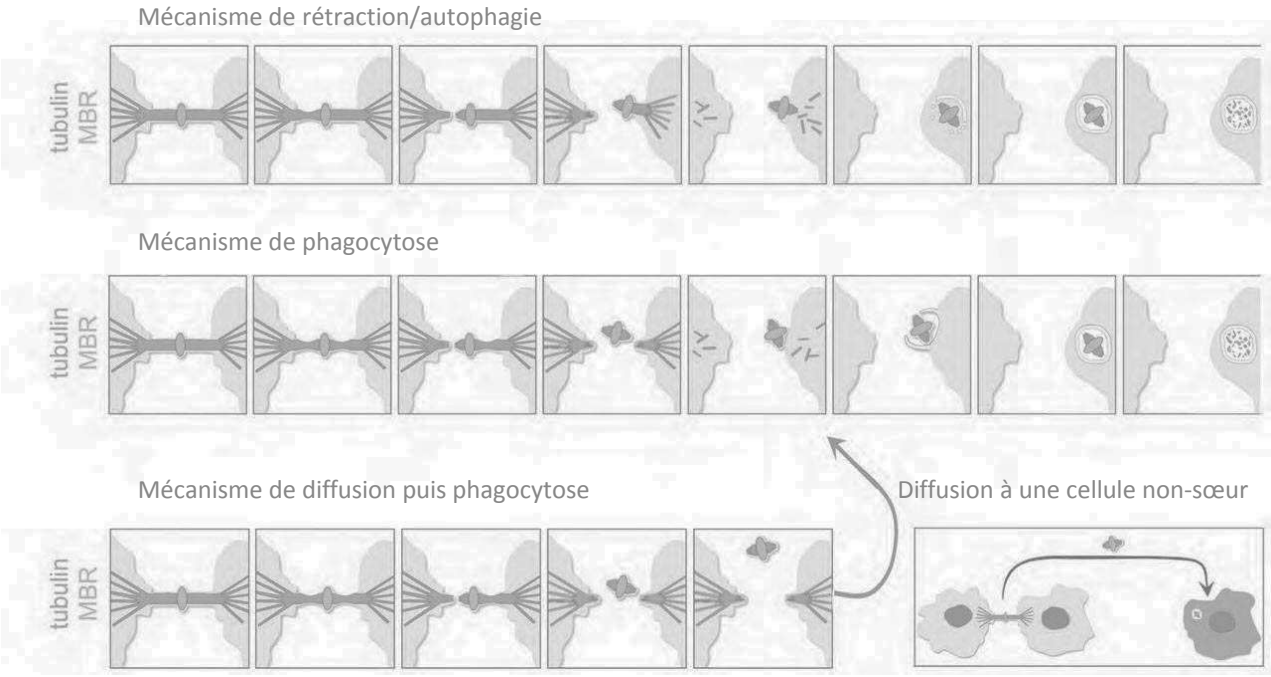
1.5.3. Aneuploïdie phathologique : les défauts d'abscission

La principale conséquence des défauts d'abscision et de la fusion des deux cellules filles est l'aneuploïdie et généralement la tétraploïdie : une cellule contient un multiple du matériel génomique initial (le double dans le cas de la tétraploïdie).

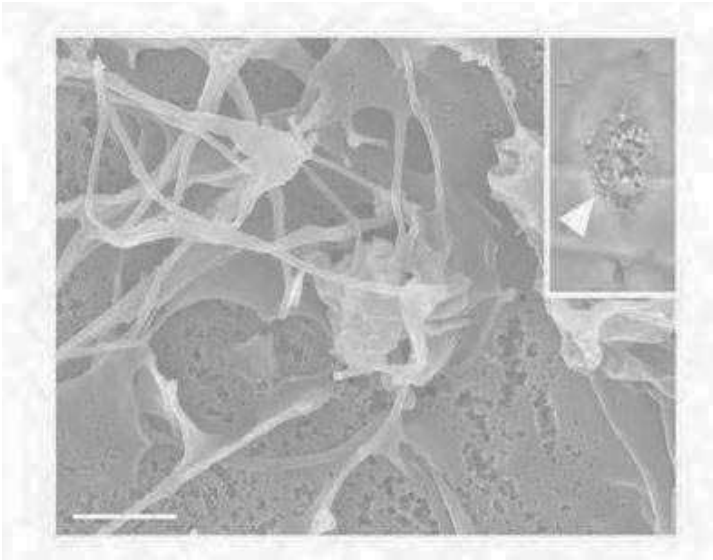
Il est aujourd'hui clairement établie que les cellules tétraploïdes sont génétiquement instables et leur présence au sein d'un tissu normalement composé de cellules diploïdes peut être à l'origine de l'apparition de tumeurs (figure 16c) (Davoli and de Lange, 2012; Fujiwara et al., 2005) (Walther et al., 2008). L'instabilité génétique liée à l'aneuploïdie des cellules souches neurales a déjà été proposée comme source de certains cancers du cerveau chez l'enfant (Iourov et al., 2009b). Des analyses quantitatives récentes estiment à près de 1/5ème le nombre de tumeurs solides qui présentent une tétraploïdie et plus de 1/3 des cancers chez l'homme auraient subit le passage par une étape d'aneuploïdie durant leur évolution (Dewhurst et al., 2014; Zack et al., 2013). Dans les cancers du cerveau que sont les glioblastomes, la présence de cellules aneuploïdes est largement décrite et très récemment, dans une lignée cellulaire de glioblastome, il a été décrit que cette aneuploïdie peut résulter d'un défaut de cytocinèse (Telentschak et al., 2015).

La plupart du temps les cellules aneuploïdes vont majoritairement être orientées vers un destin délétère pour la cellule. Il a été décrit dès la fin des années 60 que les cellules tétraploïdes subissent une limitation puis un arrêt de leur prolifération sur les cycles suivant leur altération génomique (Carter, 1967). Depuis, le rôle majeur de la protéine p53 a été impliqué et dans des cellules HCT116, l'inhibition du gène de la p53 est nécessaire à l'accumulation de cellules aneuploïdes (Thompson and Compton, 2010). Les cellules tétraploïdes présentent des anomalies du cytosquelette, des centrosomes surnuméraires, des défauts de ségrégation des chromosomes, tout cela aboutissant à une activation et à l'accumulation de la protéine p53 capable de bloquer la progression du cycle cellulaire (Ganem et al., 2014). L'activation de la mort cellulaire par apoptose est également un mécanisme fréquent d'élimination physiologique des cellules aneuploïdes au sein du tissu. Un blocage des mécanismes d'exécution de l'apoptose par des mutations ou des inhibiteurs chimiques peut d'ailleurs permettre d'accroître la présence de cellules polyploïdes (Castedo et al., 2006; Joshi et al., 2011). De plus, la tétraploïdie accidentelle d'une cellule n'est pas en corrélation absolue avec l'instabilité génétique. Ainsi dans le cas de la trisomie 21, les cellules sont capables de transmettre à chaque division l'intégralité de leur génome aneuploïde à leur progéniture (Thomas et al., 2008).

a



b



<u>Figure 17</u> : le remnant
a- Différents modèles du destin des MBR après abscission.
b- Internalisation d'un MBR (vert) à la surface d'une cellule HeLa. Observation en microscopie électronique à balayage.
D'après Crowell EF. Et al., J Cell Sci, 2014.

1.6. Le Remnant

L'abscission aboutit à la séparation des deux cellules filles et le clivage du pont intercellulaire de manière asymétrique par rapport au midbody génère un «résidus» d'abscission, le remnant ou MBR (midbody remnant), qui se compose du midbody intact.

1.6.1. Quelle est sa composition ?

La composition exhaustive du MBR n'a pas été réalisée à ce jour, par exemple par une purification différentielle puis une spectrométrie de masse. Cependant l'on peut considérer qu'il se compose des protéines du midbody et de la membrane qui l'entoure. Par immunofluorescence, le MBR a été visualisé à l'aide de marquages contre MKLP1, Arf6, FIP3, Citron Kinase, PRC1, Kif14, Anillin, CEP55, tubuline et prominin-1 (Crowell et al., 2014; Dubreuil et al., 2007; Ettinger et al., 2011; Kuo et al., 2011; Takahashi et al., 2011). L'actine, la myosine et les lipides membranaires devraient également permettre de les détecter.

1.6.2. Diffusé ou directement hérité ?

Deux modèles existent pour l'héritage du MBR par les cellules (figure 17a).
Durant l'abscission précoce, il existe un instant pendant lequel le MBR est séparé d'une des cellules filles mais toujours connectées à la seconde. Il pourrait alors être directement englouti par cette dernière par un mécanisme de rétraction membranaire par exemple, c'est un premier modèle (Ettinger et al., 2011; Kuo et al., 2011; Pohl, 2009).
Le second modèle propose que le MBR soit clivé de part et d'autre du midbody et se retrouve diffusé dans le milieu extra cellulaire (Ettinger et al., 2011). Ce modèle a été très élégamment confirmé, par une analyse en vidéomicroscopie, avec plusieurs lignées cellulaires, dans laquelle les auteurs ont suivi la diffusion de ce MBR (Crowell et al., 2014). Ce modèle de MBR diffusible semble d'ailleurs concerner la majorité des cellules observées lors de l'étude (20 cellules HeLa sur 23 filmées). Ce MBR peut d'ailleurs persister à la surface des cellules pendant plusieurs heures avant de disparaitre (environ 11 heures dans des cellules HeLa). De plus, ces mêmes auteurs proposent que le MBR ne soit pas seulement hérité par l'une des deux cellules filles mais qu'il peut également être diffusé à plus longue distance et

être capté par une cellule non concernée par la mitose ayant aboutie à la formation de ce remnant (Crowell et al., 2014). Cette diffusion du MBR dans le milieu extracellulaire a également été confirmé récemment *in vivo* chez C. elegans et la Drosophile (Ou et al., 2014; Salzmann et al., 2014).

1.6.3. Recyclage du remnant

Si le MBR peut être détecté pendant plusieurs heures à la surface d'une cellule, il est à terme capté puis internalisé par la cellule dans un mécanisme similaire à la phagocytose (figure 17b). Des protrusions de la membrane plasmique recouvrent partiellement ou totalement le MBR juste avant que celui-ci ne disparaisse de la surface de la cellule (Crowell et al., 2014). Des contractions d'actine au site de phagocytose sont également observées et si l'on traite les cellules avec un inhibiteur de la polymèrisation de l'actine, la Latrunculine, les MBR persistent anormalement à la surface des cellules (Crowell et al., 2014).
Une fois pénétré dans l'espace intracellulaire le MBR s'associe ensuite aux lysosomes dans lesquels il va être dégradé (Crowell et al., 2014; Pohl and Jentsch, 2009). Un traitement des cellules avec des inhibiteurs de l'activité lysosomale induit une persistance des MBR dans le cytosol de la cellule (Crowell et al., 2014; Ettinger et al., 2011; Kuo et al., 2011; Pohl and Jentsch, 2009). Cependant certains types cellulaires ne dégradent apparemment pas le MBR dont elles héritent. C'est notamment le cas des cellules souches, qui ont un mécanisme d'autophagie modérée et semblent ne pas reconnaitre le MBR comme un substrat à dégrader par les lysosomes (Kuo et al., 2011).

2. La communication cellulaire et la signalisation Eph/éphrine

2.1 Notion de communication cellulaire

L'étude de la communication cellulaire s'intéresse à la manière dont les cellules diffusent et reçoivent des informations de leur environnement. Les cellules qui composent un organisme ne sont pas des entités isolées. Leur survie dépend notamment de leur capacité à communiquer avec leur environnement que ce soit pour la disponibilité en nutriments, l'appréciation des changements de température ou de luminosité pour les cellules qui y sont exposées. Mais les cellules peuvent aussi communiquer directement avec d'autres cellules, dans leur environnement immédiat ou plus distant, à travers une variété de signaux mécaniques et chimiques. Ceci est d'autant plus vrai dans les organismes cellulaires où l'organisation en tissus assure des fonctions spécifiques pour la survie de l'organisme entier et dépend de la communication cellulaire.

La communication cellulaire implique la présence de protéines à la surface des cellules qui peuvent être de deux types : Les protéines s'organisent en canaux et permettent la diffusion de molécules et d'ions à travers la membrane plasmique. Les protéines adoptent une conformation particulière au sein de la membrane plasmique, sans modifier sa perméabilité, et constituent ainsi des récepteurs capables de connecter la cellule à son environnement en traduisant biochimiquement les stimuli perçus à sa surface.

Il existe des récepteurs capables de capter des stimuli diffusibles que sont par exemple les hormones, les neurotransmetteurs ou les cytokines et qui peuvent être véhiculés par l'organisme sur de longues distances.
Il existe aussi une des récepteurs uniquement capables de percevoir des stimuli issus de l'environnement immédiat. Ces stimuli sont alors des protéines non diffusibles présentes à la surface des cellules voisines. Parmi ces couples récepteurs-ligands, impliqués dans la communication cellulaire locale, la famille des Eph-éphrines est celle qui suscite mon intérêt et que j'aborde dans ce chapitre du mémoire.

2.2 La famille des Eph/éphrine

2.2.1 Point de vue historique

Le premier membre de la famille, EphA1, a été cloné il y a plus d'une vingtaine d'années à partir d'une lignée cellulaire humaine de carcinome hépatocellulaire produisant de l'érythropoïétine, et tire son nom de l'anglais « Erythropoietin-Producing Hepatocellular » (Hirai et al., 1987). Les auteurs avaient alors identifié la protéine codée par ce gène comme un récepteur à Tyrosine kinase de par son homologie de séquence mais ils proposaient déjà de le considérer comme le membre d'une nouvelle classe de récepteurs à Tyrosine kinase. Aujourd'hui cette famille se compose chez les mammifères de 14 récepteurs transmembranaires qui forment la famille la plus large connue à ce jour de récepteurs à activité Tyrosine Kinase (RTKs). A la différence des autres RTKs dont les ligands sont soit solubles soit séquestrés dans la matrice extracellulaire, les ligands des récepteurs Eph, appelés les éphrines (Eph receptor-interacting), sont également des protéines membranaires. Ce couple récepteur-ligand est d'ailleurs original à plus d'un titre :

1/ l'interaction entre le récepteur et son ligand induit une signalisation classique appelée « Forward » dans la cellule qui présente le récepteur **ET** une signalisation intracellulaire est également activée dans la cellule présentant le ligand, la signalisation « Reverse ». C'est donc une signalisation **bidirectionnelle**

2/ la signalisation en aval d'une même molécule Eph ou éphrine peut avoir, selon le contexte cellulaire, des effets opposés

3/ Enfin, il existe une diversité d'affinités entre les divers membres de cette famille de protéines qui permet une palette large de modulation de la signalisation à laquelle s'ajoute des interactions avec d'autres RTKs, des protéines de la matrice extracellulaire, des petites GTPases, des protéases et phosphatases et des enzymes protéolytiques.

Tout ceci fait de la famille des Eph-ephrine une famille de protéines largement impliquée dans les processus de communication cellules-cellules et cellules-microenvironnement qui vont du tri cellulaire, de la formation des tissus, de la vasculogénèse et de la guidance axonale durant l'embryogénèse à la plasticité synaptique, le remodelage et l'homéostasie tissulaire, la réponse inflammatoire et immunitaire chez l'adulte. C'est également une famille de protéines largement impliquée dans des processus pathologiques comme les cancers.

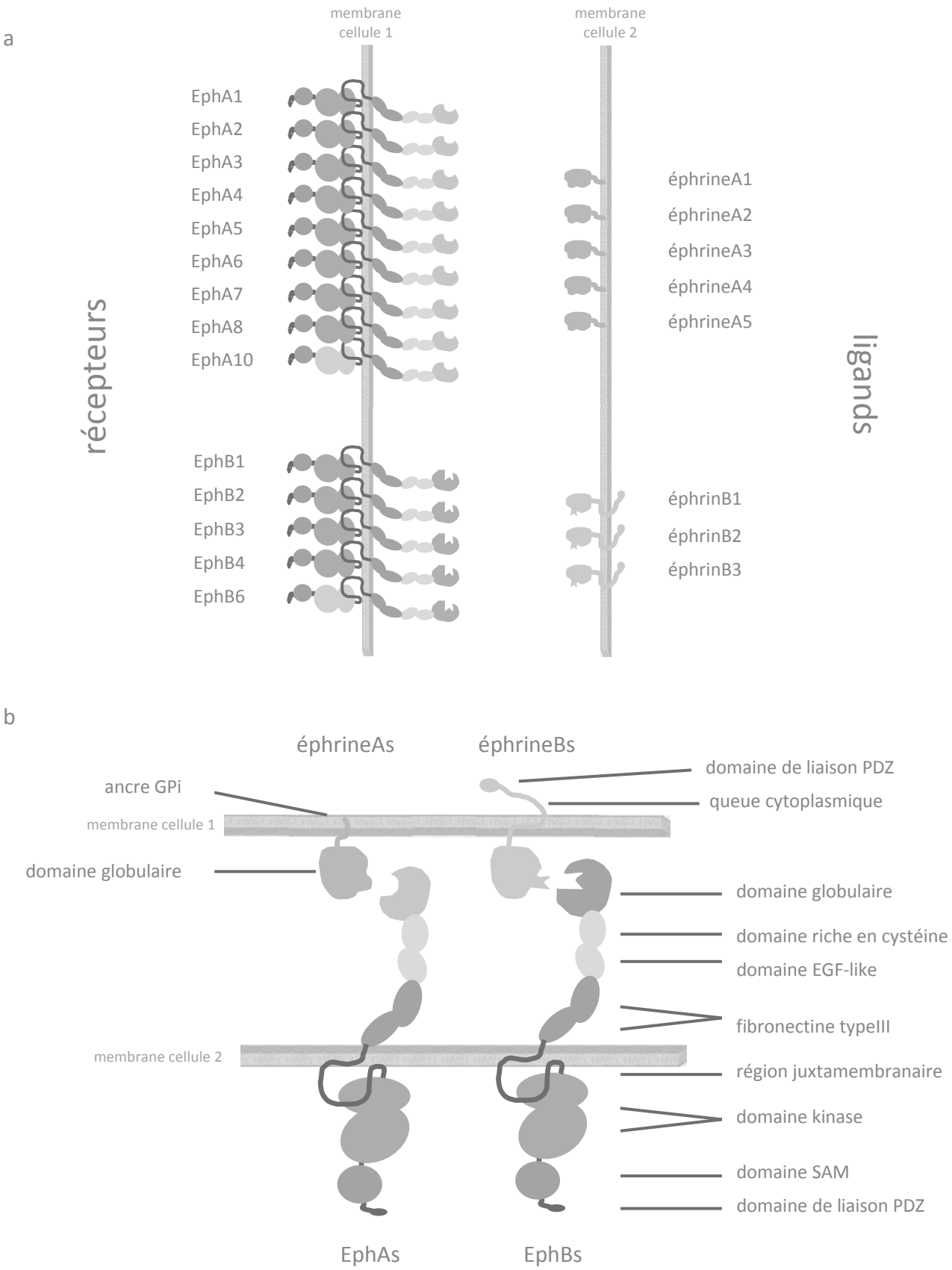


Figure 18 : La famille des Ephs-éphrines
a- Classe des récepteurs Ephs et des ligands éphrines chez les mammifères
b- Détail de la structure des ligands éphrines et des récepteurs Ephs chez les mammifères.

2.2.2 Les récepteurs : les Ephs

Les récepteurs Ephs se répartissent en deux sous classes A et B (figure 18). Cette répartition initialement basée sur leur homologie de séquences se retrouve également correspondre à leur affinité pour les divers ligands (comittee, 1997)(pour une revue voir (Pasquale, 2010)) . Le sous-groupe des EphAs chez l'homme se compose de 9 récepteurs, EphA1 à EphA8 et EphA10. Le sous-groupe des EphBs se compose de 5 membres, EphB1 à EphB4 et EphB6 (figure 18a). Les EphAs et les EphBs partagent une très forte homologie de structure (figure 18b): Le domaine extracellulaire des EphAs et EphBs se compose en N-terminal d'un domaine globulaire responsable de la liaison aux ligands suivi d'un domaine riche en cystéine, d'un domaine EGF-like puis de deux unités répétées de fibronectine de type-III. Le domaine globulaire et le domaine riche en cystéine sont responsables de la dimérisation et du regroupement des récepteurs (Himanen et al., 2010). Ce domaine transmembranaire est immédiatement suivi d'une région juxtamembranaire qui contrôle l'activité enzymatique du récepteur, du domaine catalytique tyrosine kinase, puis dans cet ordre, de domaines de fixation de type stérile α motif SAM, post-synaptic Density PSD95, Drosophila Disc large tumor DlgA, et de protéines à domaine PDZ (Himanen and Nikolov, 2003). La présence d'un domaine de fixation pour les protéines à PDZ est caractéristique de molécules impliquées dans l'assemblage de complexes multiprotéiques de signalisation (pour une revue récente sur les domaines PDZ voir (Ye and Zhang, 2013)). Les résidus Tyrosine sont très hautement conservés entre les divers récepteurs au sein du domaine juxtamembranaire et du domaine kinase (Binns et al., 2000; Himanen and Nikolov, 2003). Seuls deux récepteurs EphA10 et EphB6 sont dépourvus d'activité kinase (Aasheim et al., 2005; Gurniak and Berg, 1996).

2.2.3 Les ligands : les éphrines

Les ligands éphrines se répartissent également en deux sous classes A et B, en fonction de leur mode d'attachement à la membrane plasmique (figure 18). Les éphrines-A et B possèdent un domaine extracellulaire de fixation aux récepteurs hautement conservé. Les 5 éphrines-A, éphrine-A1 à éphrine-A5 sont attachées à la membrane par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) alors que les 3 éphrines-B, éphrine-B1 à éphrine-B3,

possèdent un domaine transmembranaire avec une queue cytoplasmique présentant un site de fixation des protéines à PDZ (figure 18a et b). Le domaine extracellulaire des éphrines est responsable de l'affinité pour les récepteurs et récemment il a été décrit que des évènements de glycosylation régulent l'efficacité de liaison ligand-récepteur (Ferluga et al., 2013).

L'interaction ligand-récepteur se fait spécifiquement à l'intérieur d'une même classe A ou B à quelques exceptions près : Le récepteur EphA4 peut fixer les 3 éphrines-Bs (Qin et al., 2010), le récepteur EphB2 peut fixer éphrine-A5 et le récepteur EphB4 ne peut pas fixer d'autres ligands qu'éphrine-B2 (pour une revue voir (Pasquale, 2010)).

2.3 La signalisation Eph/ephrine

La signalisation Eph-éphrine a lieu après un contact entre le domaine extra-cellulaire d'un ligand et le domaine extracellulaire d'un récepteur. Ce contact induit pour les récepteurs et les ligands de type B des changements de conformation de leurs domaines intracellulaires et la phosphorylation de résidus tyrosines permettant l'activation de cascades moléculaires. Ainsi il existe une signalisation potentielle simultanément dans les deux cellules voisines impliquées dans un contact ligand-récepteur.

2.3.1 Interaction ligand/récepteur

A la différence des autres RTKs, la signalisation en aval du récepteur Eph dépend de la fixation d'un ligand non soluble, attaché à la membrane plasmique ou regroupé en complexes (Davis et al., 1994). Cette particularité impose d'ailleurs *in vitro* de réaliser artificiellement un pré-complexe en utilisant soit des ligands solubles fortement concentrés, soit en utilisant des ligands solubles complexés avec des IgG humaines. L'utilisation de ligands solubles non complexés a au contraire des effets antagonistes sur la voie Eph (Dobrzanski et al., 2004).

Tant qu'il n'y a pas d'interaction avec leurs ligands, les récepteurs sont répartis de manière diffuse sur la membrane plasmique avec une activité kinase minimale dite résiduelle (Vearing and Lackmann, 2005). L'interaction ligand-récepteur se fait initialement par le contact du domaine extracellulaire d'un ligand avec le domaine globulaire d'un récepteur pour lequel l'affinité est forte (figure 19). En détail, il a été montré que cette interaction se

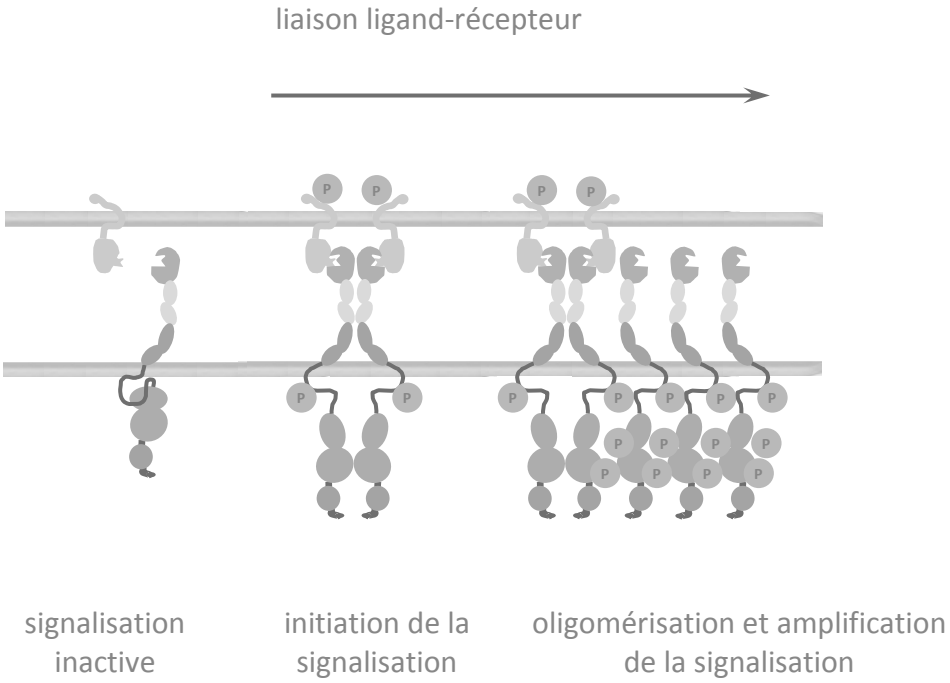


Figure 19 : Interaction ligand- récepteur
L'interaction d'un dimère de ligands et d'un dimère de récepteurs induit un changement de conformation de la partie juxtamembranaire des récepteurs et la trans-phosphorylation des domaines kinases entre récepteurs adjacents. L'oligomérisation des récepteurs indépendamment de la présentation de nouveaux ligands amplifie la signalisation en aval par trans-phosphorylation.

réalise par l'insertion d'une boucle hydrophobe de type G-H du domaine de liaison du ligand dans une cavité également hydrophobe présente dans le domaine globulaire du récepteur (Ferluga et al., 2013; Himanen and Nikolov, 2003; Himanen et al., 2001; Lema Tome et al., 2012). Ce couple ligand-récepteur n'est cependant pas suffisant pour induire une signalisation et il faut au moins la formation d'un tétramère de récepteurs pour que la signalisation soit efficace (Stein et al., 1998). Le recrutement d'autres ligands et récepteurs abouti à ce que chaque ligand soit en contact avec deux récepteurs et que chaque récepteur soit également en contact avec deux ligands au sein du tétramère (figure 19) (Himanen et al., 2001; Himanen et al., 2010). Ensuite l'oligomérisation des récepteurs peut se poursuivre indépendamment de la liaison avec un ligand par l'interaction des domaines globulaires et des domaines riches en cystéine (Himanen et al., 2010; Wimmer-Kleikamp et al., 2004; Xu et al., 2013). Cette oligomérisation autonome explique en partie le fait qu'à fortes concentrations les récepteurs sont capables d'avoir une activité kinase en l'absence de ligand (Vearing and Lackmann, 2005).

La fixation d'un ligand par le récepteur induit un changement de conformation du récepteur. Il existe une auto-inhibition initiale de l'activité kinase du récepteur par le repliement du domaine kinase sur la région juxtamembranaire (Binns et al., 2000). Cette inhibition est levée par la transphosphorylation d'un résidu tyrosine dans le domaine kinase puis la phosphorylation de deux résidus tyrosine supplémentaires dans la région juxtamembranaire (Binns et al., 2000; Davis et al., 2008; Kalo and Pasquale, 1999; Singla et al., 2011; Wiesner et al., 2006; Wybenga-Groot et al., 2001). Contrairement au concept initialement proposé l'oligomérisation et l'autophosphorylation des récepteurs ne se fait pas uniquement par homotypie ou au sein d'une même sous classe de récepteurs mais peut impliquer des récepteurs de type et classes distincts (Janes et al., 2011). On parle d'hétéro-oligomérisation. Par exemple, le récepteur EphA4 est capable de phosphoryler *in vitro* la région juxtamembranaire des récepteurs EphA2 mais aussi EphB2 (Warner et al., 2008) tout comme EphA3 peut également activer EphB2 (Janes et al., 2011). Par une approche de phosphoprotéomique il a également été décrit que les récepteurs EphA2, EphA3, EphA7, EphB4, EphB2 et EphB3 peuvent être phosphorylés par stimulation avec le ligand éphrine-B1 alors que seuls les deux derniers récepteurs de cette liste sont reconnus comme pouvant lier directement éphrine-B1 (Bush and Soriano, 2010). De plus, les récepteurs EphA10 et EphB6 étant dépourvu d'activité kinase, il est proposé qu'ils jouent un rôle de modulateur de la réponse Eph forward en participant à l'oligomérisation avec d'autres récepteurs de type ou classe distincts (Fox and Kandpal, 2011; Truitt and Freywald, 2011). Pour une revue récente abordant de façon exhaustive l'oligomérisation des récepteurs Ephs voir (Janes et al., 2012).

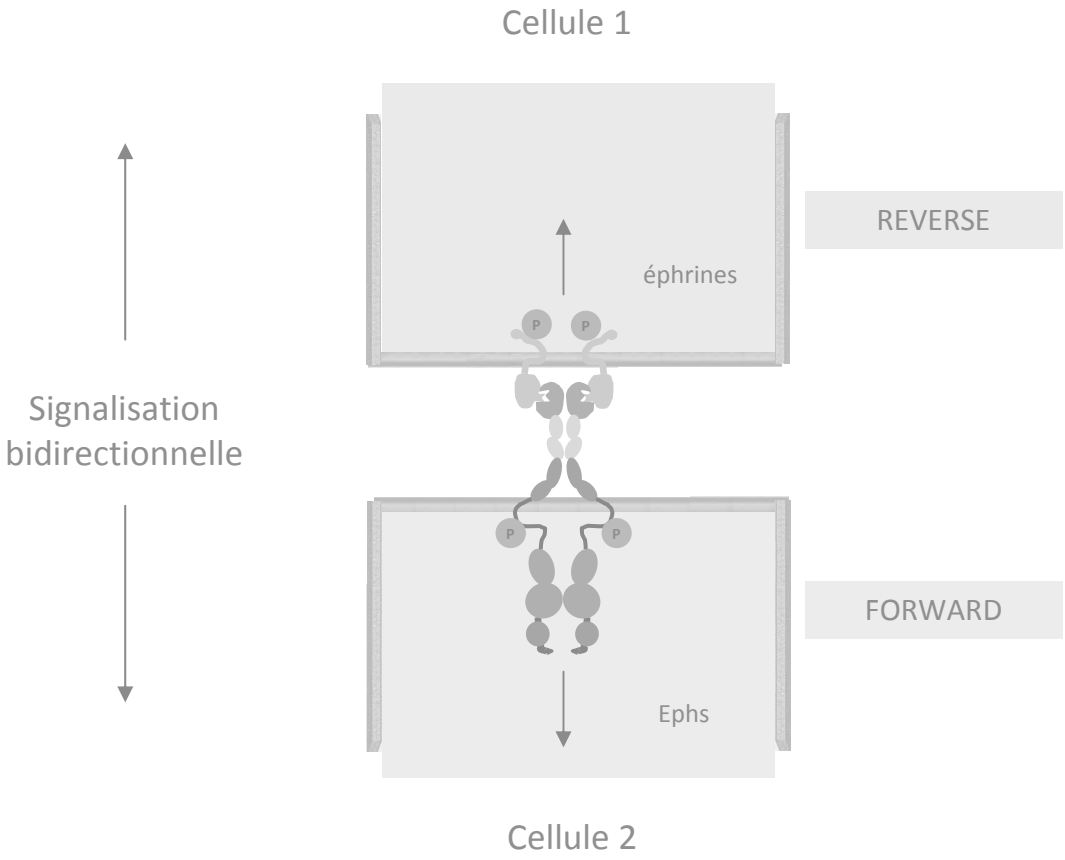


Figure 20 : Signalisation bidirectionnelle
L'interaction des ligands et des récepteurs de deux cellules voisines induit une signalisation bidirectionnelle : FORWARD en aval des récepteurs et REVERSE en aval des ligands.

2.3.2 Signalisation bidirectionnelle

La signalisation bidirectionnelle est une des caractéristiques majeures de la signalisation Eph-éphrine (figure 20). C'était encore jusqu'à récemment et la description d'une signalisation reverse au sein du couple NOTCH/DELTA (Holderfield and Hughes, 2008) le seul couple ligand-récepteur connu pour générer une telle double signalisation.

La signalisation intracellulaire en aval du récepteur Eph est dite « FORWARD » ou parfois ligand-induite ou antérograde.

La signalisation intracellulaire en aval du ligand éphrine est dite « REVERSE » ou récepteur-induite ou rétrograde.

Cette signalisation bidirectionnelle est un mécanisme de communication cellulaire unique. Dans une signalisation unidirectionnelle classique, seule une des deux cellules en contact reçoit un signal intracellulaire, la seconde ne recevant aucune signalisation. Dans le cas d'une signalisation bidirectionnelle les deux cellules reçoivent simultanément une information intracellulaire. Ces signalisations impliquent des cascades moléculaires différentes et peuvent générer des processus cellulaires opposés. Un exemple illustre l'avantage porté par cette signalisation bidirectionnelle et a été décrit dans la formation des rhombomères chez le poisson zèbre. Lors de la segmentation du cerveau postérieur apparait une expression alternative de ligands et de récepteurs sur chaque futur segment (Xu et al., 1995). Il a été démontré qu'une signalisation unidirectionnelle au niveau des rhombomères R3 et R4 ne permet pas la mise en place d'une segmentation franche, contrairement à une signalisation bidirectionnelle entre éphrineB2 et EphA4 (Kemp et al., 2009; Mellitzer et al., 1999; Xu et al., 1996).

Cette bidirectionnalité potentielle rend la signalisation Eph-éphrine hautement complexe à étudier. Par exemple, lorsque l'on génère un animal dépourvu d'un ligand, on affecte non seulement la signalisation reverse dans la cellule qui ne présente plus ce ligand mais consécutivement la signalisation forward dans la cellule voisine, même si le récepteur est toujours exprimé dans cette cellule. Ainsi, l'utilisation de formes alternativement tronquées pour les domaines extracellulaires ou intracellulaires des récepteurs et ligands est devenue une stratégie incontournable pour l'étude de la signalisation Eph-éphrine. Elle permet d'inhiber sélectivement la signalisation forward ou reverse sans altérer la signalisation en « miroir ». Par exemple, afin de démontrer l'implication de la signalisation reverse dans

respectivement des défauts osseux de la face et des défauts de fermeture du tube chez la souris, des stratégies de mutations et délétions totales ou partielles des domaines intracytoplasmiques d'éphrineB1 et d'éphrineB2 ont été utilisés pour affiner des observations initiales faites avec des pertes de fonctions complètes (Davy et al., 2004; Dravis and Henkemeyer, 2011). Des stratégies remplaçant le domaine intracellulaire par des protéines reportrices permettent de suivre l'expression des Ephs et des éphrines. Par exemple, l'utilisation de souris Knock-in exprimant les récepteurs EphB1 et EphB2 dont les domaines intracellulaires ont été remplacés par l'enzyme β-galactosidase, permet par des marquages immunocytochimiques de suivre l'expression d'EphB1 et d'EphB2 (Chenaux and Henkemeyer, 2011). A ce jour, il n'existe pas de protéines rapportrices de l'activité de la signalisation Eph/éphrine. L'utilisation d'anticorps spécifiques des phosphorylations des domaines juxtamembranaires des récepteurs Ephs ou des ligands éphrineBs est donc une alternative répandue et acceptée comme témoin de l'activité de la signalisation en aval de chacun d'eux (Janes et al., 2011).

2.3.3 Cis-inhibition

Si l'interaction d'un ligand avec un récepteur issu de deux cellules voisines dénommée *trans*-interaction est connue de longue date, il a été décrit plus récemment que des récepteurs et des ligands présents à la surface de la même cellule peuvent interagir ensemble (Hornberger et al., 1999). On parle alors de *cis*-interaction. Cette *cis*-interaction a pour l'instant uniquement été décrite dans des mécanismes d'inhibition de la signalisation et on parle donc plus volontiers de *cis*-inhibition pour les couples ligands-récepteurs présents dans la même cellule (Yin et al., 2004) (Carvalho et al., 2006). Par exemple, dans le tube neural de poulet et de souris, l'innervation des bourgeons de membre par les neurones moteurs se fait sous le contrôle de la signalisation Eph-éphrine. Lors du guidage axonal de ces neurones moteurs, la *cis*-atténuation de l'activité des récepteurs participe à la bonne définition des territoires à innerver (Kao and Kania, 2011). Dans des cellules cancéreuses le ligand éphrineA3 co-exprimé avec les récepteurs EphA2 et EphA3 dans la même cellule inhibe la capacité de ces récepteurs à lier les éphrines en *trans* (Falivelli et al., 2013). L'association en *cis* d'éphrineA3 et EphA2 ou EphA3 aboutit donc à l'inhibition de la signalisation forward. Biologiquement, ces résultats suggèrent que la surexpression des ligands dans les tumeurs,

pourrait atténuer par *cis*-inhibition l'activité des fonctions suppressives des tumeurs de certains récepteurs et ainsi participer à la virulence des cancers (Falivelli et al., 2013).

2.3.4 Interactions avec d'autres récepteurs

La possibilité d'une interaction des récepteurs Ephs avec d'autres récepteurs de type RTKs a été proposé depuis longtemps. Par exemple, le récepteur EphA4 et le récepteur au FGF (FGFR) peuvent se phosporyler mutuellement et partagent des cascades de signalisation communes comme la voie MAPK (Park et al., 2004; Yokote et al., 2005). Le récepteur EphA2 et le récepteur à l'EGF (EGFR) colocalisent aux points de contacts cellulaires et sont co-activés dans des mécanismes d'adhésion cellulaire (Larsen et al., 2007; Larsen et al., 2010). Une analyse de l'interactome d'EGFR a confirmé cette interaction et l'a élargie aux récepteurs EphA3 et EphB4 (Komurov et al., 2010). Le récepteur EphA2 est capable de favoriser la progression des métastases en amplifiant la signalisation induite par le récepteur ErbB2 (Brantley-Sieders et al., 2008). Les récepteurs EphAs et EphBs ont également un rôle dans la vasculogénèse et interagissent dans ce cas avec le récepteur au VEGF (VEGFR) (Kim et al., 2002; Ojima et al., 2006). Les récepteurs Ephs interagissent également avec le récepteur RYK, un RTK atypique car dépourvu d'activité kinase (Halford et al., 2000; Trivier and Ganesan, 2002). Le récepteur RYK agirait alors comme un modulateur de l'activité tyrosine kinase des récepteurs Ephs (Kamitori et al., 2005).

2.4 Principales cascades moléculaires en aval de la signalisation Eph/ephrine

2.4.1 Signalisation Forward

La signalisation induite en aval des récepteurs utilise des protéines effectrices et adaptatrices partagées avec la plupart des autres récepteurs de type RTKs (figure 21) (Wagner et al., 2013). La phosphorylation du domaine juxtamembranaire des récepteurs rend possible la liaison des domaines de type SH2/SH3. Ces sites sont reconnus par une multitude de protéines qui contiennent un domaine SH2. Par exemple l'enzyme PI3kinase est capable de fixer le récepteur EphB4 activé puis de phosphoryler à son tour la protéine signal AKT dans des cellules endothéliales (Steinle et al., 2002), tout comme la kinase FAK

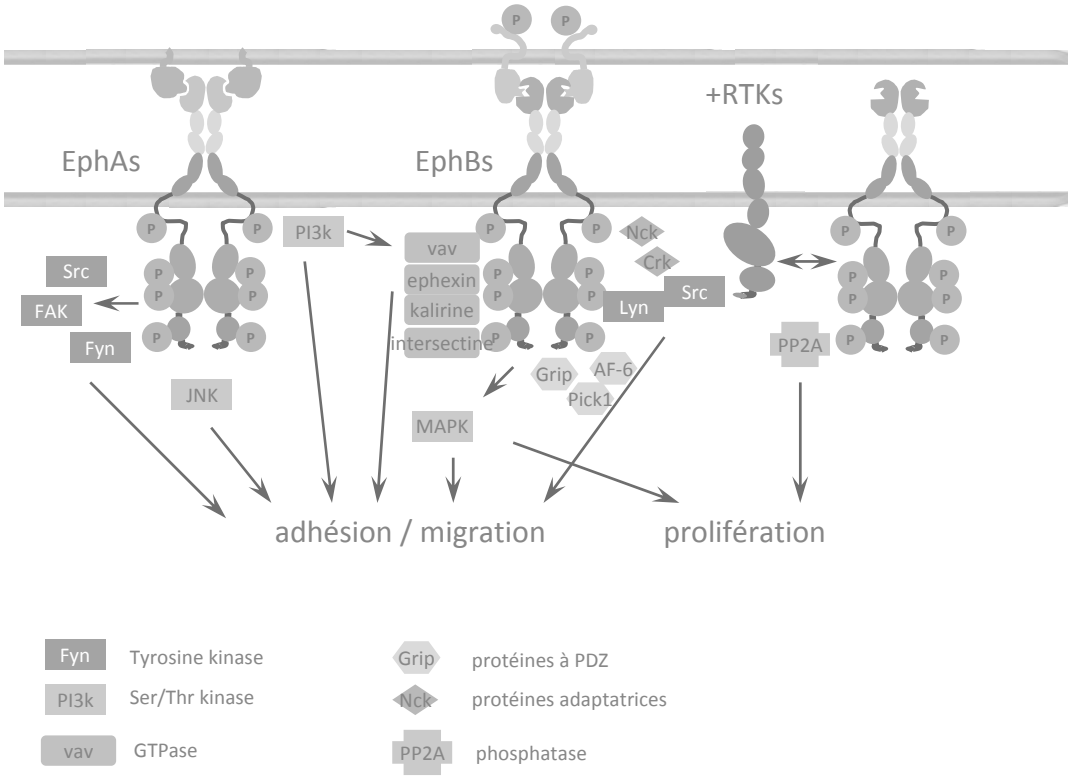


Figure 21 : signalisation FORWARD
Voir texte pour détails

(Focal adhesion kinase) fixe le récepteur EphB2 actif dans les neurones (Shi et al., 2009) et la kinase Janus kinase (JNK) est activée en aval d'EphA4 dans les cellules musculaires (Lai et al., 2004). Des molécules adaptatrices comme les protéines Nck et Crk servent aussi de relais entre la signalisation Eph forward et des cascades moléculaires via le domaine de liaison de type SH2 (Jorgensen et al., 2009). De nombreux membres de la famille des Src kinases ont également été décrits en aval de l'activité kinase des récepteurs Ephs. C'est le cas pour la kinase Fyn en aval du récepteur EphA8 (Choi and Park, 1999), Lyn en aval d'EphA4 (Prevost et al., 2002) et la kinase c-Src en aval d'EphB2 (Georgakopoulos et al., 2006; Sato et al., 2014; Zisch et al., 1998). Le récepteur EphB1 phosphoryle directement Src pour activer la voie des MAPK (Vindis et al., 2003). EphA2 est également capable de phosphoryler Src dans de très nombreux types de cancers (Faoro et al., 2010; Sugiyama et al., 2013; Taddei et al., 2009) et une augmentation de l'activité de Src est corrélée avec une augmentation de la phosphorylation des récepteurs (Leroy et al., 2009; Naudin et al., 2014). La voie des MAP kinases (ERK) peut également être régulée en aval des récepteurs EphA et apparait généralement inhibée (Miao et al., 2001). Via leur domaine de fixation des protéines à PDZ, les récepteurs Eph peuvent interagir avec les protéines possédant de tels domaines. Ceci a par exemple déjà été démontré pour les protéines Af-6 (Hock et al., 1998), Grip (Contractor et al., 2002) et Pick1 (Zhuang et al., 2010). La voie Eph forward peut également réguler une multitude de petites GTPases comme ephexine, Vav, kalirine et intersectine (Cowan et al., 2005; Irie and Yamaguchi, 2002; Penzes et al., 2003; Shamah et al., 2001) capables d'interagir constitutivement avec les récepteurs Eph. Elle peut également activer des phosphatases comme c'est le cas pour EphB3 qui active la phosphatase PP2A (Li et al., 2012). En outre les Ephs peuvent induire via des protéases le clivage de protéines en aval de leur signalisation. La signalisation forward induite par le ligand éphrineB1 peut, via ADAM10, induire le clivage de la E-cadherine et modifier la migration des cellules souches des cryptes intestinales chez la souris (Solanas et al., 2011). Dernièrement les récepteurs EphA2 et EphB2 ont également été identifiés comme des substrats potentiels d'un autre complexe de clivage, le complexe TF/FVIIa. L'activité protéolytique de FVIIa est capable de couper le domaine extracellulaire de EphB2 après reconnaissance d'un résidu arginine particulier proposant ainsi un nouveau type de régulation de la signalisation Eph-éphrine (Eriksson et al., 2014).

2.4.2 Signalisation Reverse

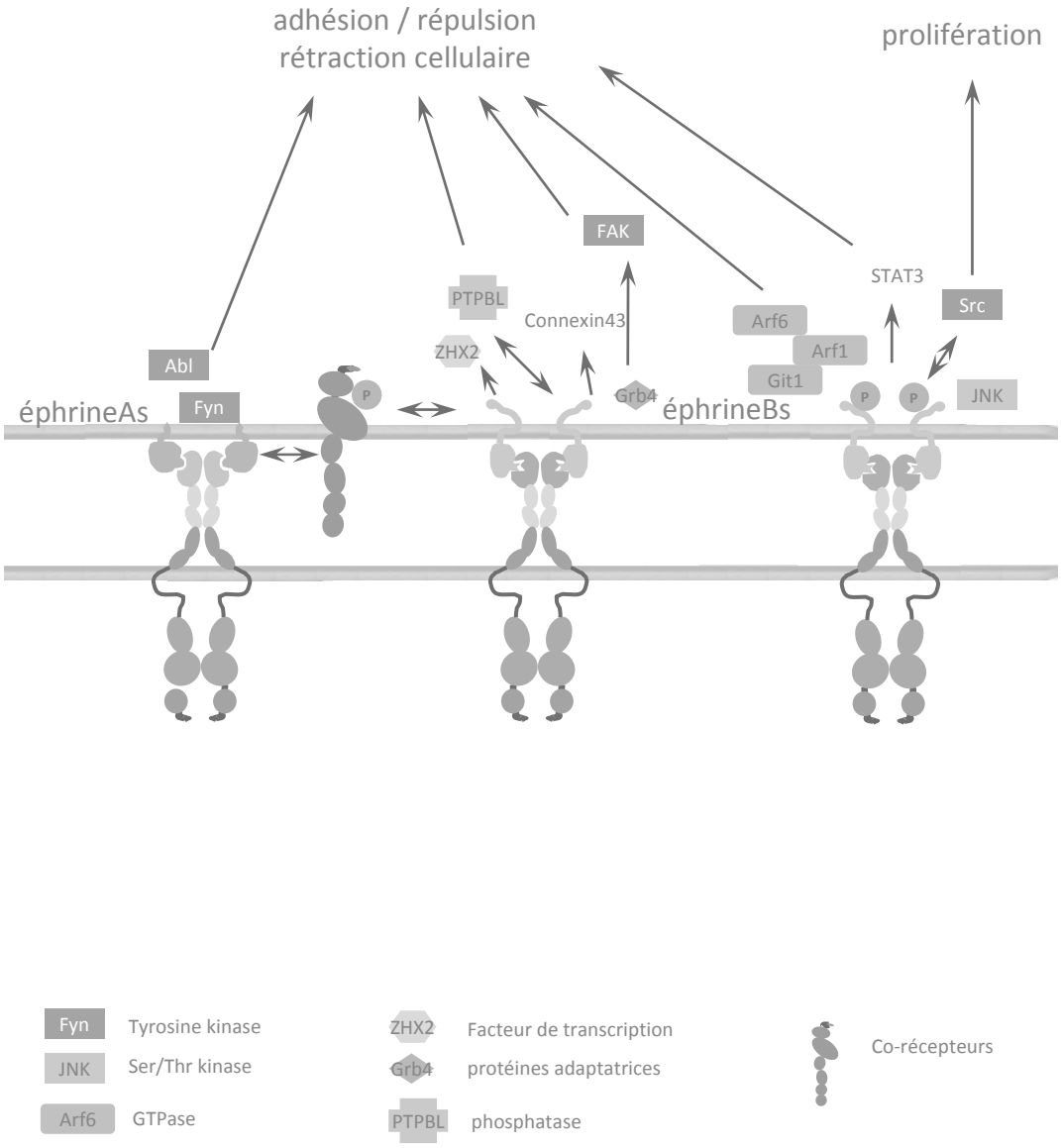


Figure 22 : signalisation REVERSE
Voir texte pour détails

On distingue généralement la signalisation Reverse en aval des récepteurs de types A de celle en aval des récepteurs de type B.

Les éphrines de typeAs sont dépourvues de domaine cytoplasmique et leur signalisation intracellulaire est moins bien comprise. Une des évidences serait que les éphrines de type A sont capables d'induire des réorganisations de la membrane plasmique et notamment des domaines riches en lipides. Il a ainsi été décrit qu'éphrineA5 recrute des kinases de la famille des Src, comme la kinase Fyn (Davy et al., 1999) et la kinase Abl (Harbott and Nobes, 2005) qui servent de relais moléculaire (figure22). Plusieurs co-récepteurs membranaires ont également été identifiés depuis comme TrkB (Marler et al., 2008) ou $P75^{NTR}$ (Lim et al., 2008).

Les éphrines de type B possèdent un domaine cytoplasmique mais il est dépourvu d'activité catalytique. Elles propagent donc leur activité intracellulaire en servant de plateforme de recrutement pour leurs relais moléculaires (figure 22). Il existe en outre une signalisation reverse dépendante de la phosphorylation des éphrines mais également une signalisation indépendante de cette phosphorylation.

L'interaction des éphrinesBs avec un récepteur adéquat permet le recrutement et l'activation de la kinase Src et de la phosphatase PTP-BL (Palmer et al., 2002). La kinase Src phosphoryle alors des résidus conservés du domaine intracellulaire des éphrinesBs (Bruckner et al., 1997) et permet le recrutement de protéines possédant un domaine SH2/SH3 comme la protéine adaptatrice Grb4 (Bong et al., 2004; Cowan and Henkemeyer, 2001; Segura et al., 2007) et la protéine signal STAT3 (Bong et al., 2007). Le recrutement de la protéine phosphatase PTB-BL se fait via le domaine de fixation des protéines à PDZ des éphrineBs en partie c-terminale et permet la mise en place d'une boucle de rétro-action sur le niveau de phosphorylation des éphrinesBs (Freiss et al., 2004; Palmer et al., 2002). La phosphorylation des domaines intracellulaires des éphrinesBs est également possible par l'interaction avec des récepteurs de facteurs de croissance comme VEGFR (Adams et al., 1999), FGFR (Lee et al., 2009), PDGFR (Bruckner et al., 1997), EGFR (Thelemann et al., 2005) et Tie2 (Pfaff et al., 2006).

Indépendamment de la phosphorylation, plusieurs interactions moléculaires ont été décrites en aval de la signalisation éphrineB, majoritairement avec éphrineB1. C'est le cas de la protéine Claudine (Tanaka et al., 2005), composant majeur des jonctions serrées. C'est aussi le cas du marqueur de polarité PAR6 (Lee et al., 2008) et de la Connexine43, composant majeur des jonctions communicantes intercellulaire (Davy et al., 2006). C'est également le cas du répresseur transcriptionnel ZHX2, responsable du maintien de l'état souche des cellules progénitrices dans le cortex cérébral murin (Wu et al., 2009). Enfin, les éphrines

peuvent aussi réguler l'activité des petites GTPases comme dans le cas d'éphrineB1 qui fixe la forme GTP de ARF1 (Tanaka et al., 2007), régule ARF6 (Arvanitis et al., 2013) et GiT-1 (Segura et al., 2007).

2.4.3 Extinction de la signalisation

L'interaction entre les ligands éphrines et leurs récepteurs Eph est une interaction de haute affinité qui lorsqu'elle persiste maintient la signalisation bidirectionnelle active. Aussi, il existe des mécanismes qui permettent de mettre un terme à cette interaction et ainsi inactiver la signalisation intracellulaire.

Les parties extracellulaires des ligands et récepteurs peuvent tout simplement être clivés engendrant la dissociation des complexes. Pour les éphrines, des protéases comme les ADAM (A Disintegrin And Metalloprotéinase), ont été identifiées comme capable de cliver les ligands de types A et B, à la fois en *cis*-interaction, lorsque les protéases sont exprimées dans la cellule présentatrice du ligand, mais également en *trans* interaction, lorsque les métalloprotéases sont exprimées par la cellule opposée (Janes et al., 2005). D'une manière générale les métalloprotéases de type ADAM sont constitutivement associées aux récepteurs Ephs dans leur forme inactive. La formation du complexe ligand-récepteur permet la reconnaissance d'un site de clivage présent sur le domaine extracellulaire des éphrines et reconnu par les protéases de type ADAM (Janes et al., 2005; Janes et al., 2009). Ceci a été décrit par exemple pour les couples ADAM10/EphA2 (Janes et al., 2009), ADAM9/EphA4 (Yumoto et al., 2008), et ADAM10/EphBs (Solanas et al., 2011). Les domaines intracellulaires sont ensuite digérés par des γ-sécrétases aboutissant à la formation de fragments intracellulaires. Par exemple, il a été montré dans le cas d'une interaction EphB-éphrineB2 que le domaine intracellulaire d'éphrineB2 peut être digéré par la γ-sécrétase presenilin1 pour produire un fragment peptidique. Ce fragment peptidique est alors capable de réguler l'activation de Src en aval d'éphrineB2 et ainsi moduler la signalisation reverse intracellulaire (Georgakopoulos et al., 2011). Le domaine extracellulaire des récepteurs Ephs peut également être clivé par ces mêmes métalloprotéases, puis par des γ-sécrétases. En effet les éphrines sont aussi associées à des protéases comme par exemple les couples ADAM12/EphrinA1 (Ieguchi et al., 2014) et MMP8/éphrineB1 (Tanaka et al., 2007).

Le désengagement du contact cellulaire via Eph-éphrine peut aussi être réalisé par endocytose. L'interaction entre des cellules EphBs positives et des cellules éphrineBs

positives induit la formation de vésicules qui renferment le complexe intègre (Marston et al., 2003; Pitulescu and Adams, 2010; Zimmer et al., 2003). La formation du complexe éphrineB1-EphB1 induit sa propre endocytose par formation de vésicules à clathrine (Parker et al., 2004).Ceci permettrait la clairance du complexe au niveau du contact des cellules voisines et l'extinction de la signalisation bidirectionnelle par adressage vers les lysosomes dans un mécanisme autophagique (Chukkapalli et al., 2014; Kandouz et al., 2010). Cependant une équipe a récemment montrée qu'au cours de cette endocytose, la signalisation Eph-éphrine restait toujours active tant que le complexe n'était pas intégralement dégradé par les lysosomes (Boissier et al., 2013). L'endocytose des complexes ligands-récepteurs apparait donc comme un mécanisme d'extinction de la signalisation moins efficace que l'action des métalloprotéases.
Enfin, il existe une extinction possible de la signalisation Eph-éphrine par l'activité de phosphatases qui déphosphorylent les domaines intracellulaires des ligands et des récepteurs. C'est le cas de la phosphatase PTP-BL pour les éphrinesBs (Freiss et al., 2004; Palmer et al., 2002). C'est aussi le cas des phosphatases PTpro et PTP1B capables d'éteindre l'activité des récepteurs A et B (Nievergall et al., 2010; Shintani et al., 2006).

2.5 Rôles biologiques de la signalisation Eph/éphrine

La première hypothèse fonctionnelle pour la signalisation Eph-éphrine était de servir de molécules attractantes ou répulsives au cours de la croissance axonale (Tessier-Lavigne, 1995). D'ailleurs la modulation des propriétés d'adhésion et de migration est toujours le rôle principalement attribué aux Eph-éphrines. L'implication de cette signalisation a été élargie à une multitude de fonctions biologiques à la fois dans l'embryon et chez l'adulte, dans un contexte physiologique et pathologique. J'ai choisi d'en présenter quelques uns ci-après :

2.5.1 Au cours du développement embryonnaire

2.5.1.1 morphogénèse tissulaire

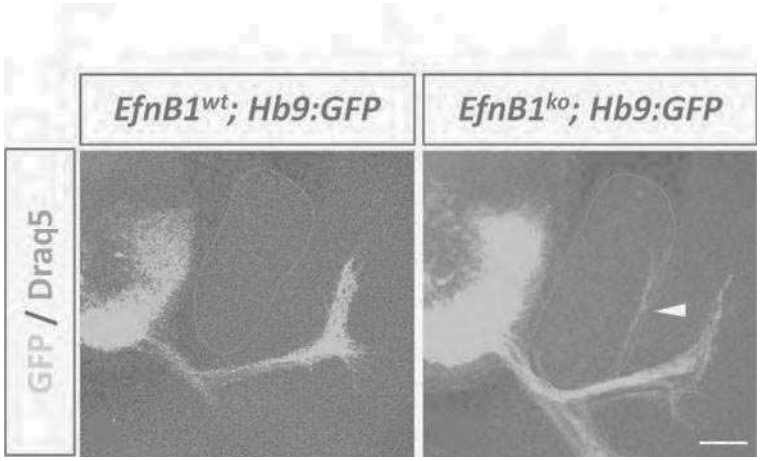
Au cours de la morphogénèse tissulaire, les cellules de l'organisme se multiplient et doivent simultanément se positionner dans leur environnement, se regrouper en fonction de leur identité, garder le contact avec certaines cellules, rompre le contact avec d'autres, se

déplacer et migrer vers leur territoire de destination. L'expression complémentaire sur deux cellules voisines des ligands et des récepteurs s'avère suffisante pour organiser de tels bouleversements au sein de l'embryon (pour une revue récente voir (Batlle and Wilkinson, 2012). Cette expression complémentaire des Ephs et éphrines est largement répandue dans de nombreux tissus au cours du développement. Par exemple dans le poisson zèbre, l'expression complémentaire du ligand éphrineB2 et du récepteur EphA4, est nécessaire et suffisante pour permettre la migration des cellules les unes par rapport aux autres et organiser leur regroupement en territoire de cellules partageant la même identité, les rhombomères (Cooke et al., 2005; Kemp et al., 2009). Chez la souris, l'expression différentielle des Ephs et des éphrines régule directement la migration des cellules des crêtes neurales vis-à-vis de ces rhombomères. Ainsi des délétions d'éphrineB1 ou des mutations dans son domaine PDZ induisent des défauts de migration des cellules des crêtes neurales et des altérations de la formation du squelette osseux (Davy et al., 2004). Un même ligand peut alternativement interagir avec des récepteurs différents pour définir des territoires et des frontières. Ainsi l'interaction d'éphrineB1 avec les récepteurs EphB2 et EphB3 organise la migration et le maintien des cellules épithéliales dans les cryptes intestinales (Batlle et al., 2002). Ces concepts de migration et tri cellulaire ont largement été reproduits *in vitro* et de nombreuses cascades moléculaires sous jacentes ont été identifiées, impliquant des modifications du cytosquelette d'actine, des réorganisations de la matrice extracellulaire et des changements de morphologies cellulaires (Jorgensen et al., 2009; Mellitzer et al., 1999; Nievergall et al., 2010; Poliakov et al., 2008).

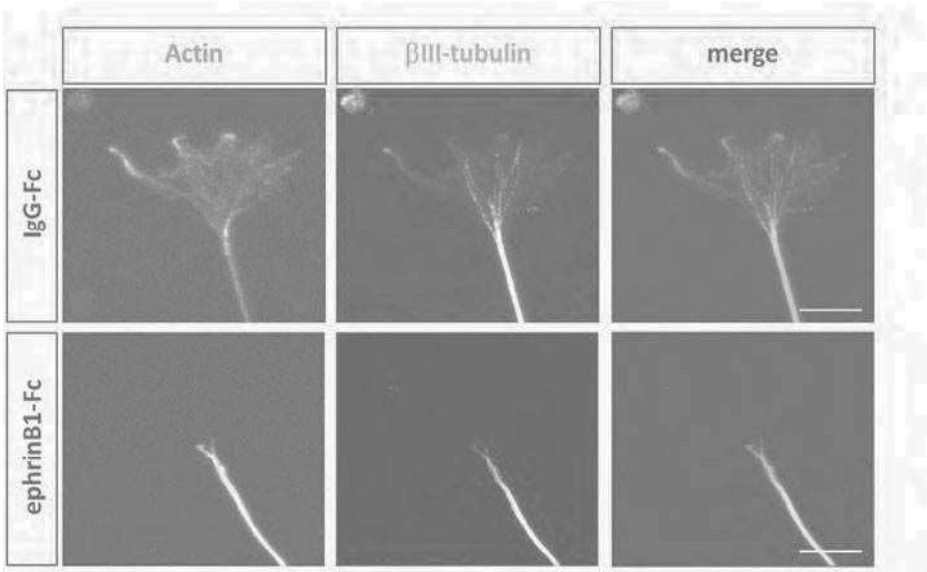
2.5.1.2 Guidage axonal

Lors de la mise en place du système nerveux central et du système nerveux périphérique, les corps cellulaires des neurones sont parfois distants des cellules cibles avec lesquelles ils doivent établir une jonction synaptique. De plus pour établir ces jonctions les axones doivent parfois naviguer à travers des territoires variés exprimant des molécules multiples à des concentrations inégales. Le guidage axonal consiste à guider le cône de croissance de l'axone, depuis son émergence à partir du corps cellulaire du neurone jusqu'à sa cellule cible. Parmi les nombreuses familles de molécules impliquées dans le guidage axonal, la famille des Eph-éphrine joue un rôle majeur (figure 23). Principalement, la signalisation Eph-éphrine régule la dynamique du cytosquelette d'actine au niveau de ce cône de croissance, induisant sa motilité, sa rétraction ou son étalement (Luxey et al., 2013). Cette régulation est

a



b



<u>Figure 23</u> : Eph:éphrine dans le guidage axonal

a- Défaut de projection des neurones moteurs dans un embryon de souris déficient pour éphrine-b1 à 12,5 jours de développement. panneau de gauche : embryon contrôle. Panneau de droite ; embryon déficient pour éphrine-b1. La pointe de flèche indique les axones de neurones moteurs qui projettent de manière ectopique.

b- Neurones moteurs issus d'embryons de souris sauvages et déposés sur un support présentant un ligand inerte (panneau du haut) ou le ligand éphrine-b1-fc (panneau du bas). Le ligand éphrine-b1-fc induit la rétraction du cône de croissance.

D'après Luxey M. et al., 2013, Dev Biol.

essentiellement relayée au niveau moléculaire par l'activité des petites GTPases comme RhoA, Rac (Wahl et al., 2000), α-chimaerin (Kao et al., 2015; Wegmeyer et al., 2007) et CDC42 (Sahin et al., 2005), (pour une revue sur le rôle d'Eph-éphrine dans le guidage axonal voir (Xu and Henkemeyer, 2012)).

2.5.1.3 Vasculogénèse et angiogénèse

De façon similaire aux cônes de croissance durant le guidage axonal, les cellules « tips » qui assurent la cartographie de la mise en place de la vascularisation, utilisent la signalisation Eph-éphrine et sont soumises à des phénomènes d'attraction-répulsion (Adams et al., 1999). Deux couples ont été largement étudiés et impliqués dans l'angiogénèse et la vasculogénèse à savoir éphrinB2-EphB4 (Krebs et al., 2010) et éphrineB2-EphB2 (Diehl et al., 2005). D'ailleurs, la souris déficiente pour éphrineB2 meurt aux alentours de 10 jours de développement *in utero*, période de mise en place de la vascularisation de l'embryon, obligeant les scientifiques à utiliser des approches d'invalidation conditionnelle pour étudier les pertes de fonction pour des stades plus tardifs (Davy and Soriano, 2007; Gerety and Anderson, 2002; Luxey et al., 2011).

2.5.1.4 Neurogénèse embryonnaire

La neurogénèse embryonnaire est le processus par lequel est réalisée l'alternance entre division cellulaire et différentiation cellulaire des progéniteurs neuraux en neurones de différents types. Il a été décrit qu'éphrineB1 est fortement exprimé dans ces progéniteurs neuraux mais s'éteint lors de la différentiation en neurones (Stuckmann et al., 2001). De plus une extinction forcée d'éphrinB1 *in vivo* induit la différentiation précoce des cellules progénitrices en neurones (Arvanitis et al., 2013; Qiu et al., 2008). Parmi les récepteurs - EphA3, EphA4, EphA7, EphB1 et EphB2 sont exprimés, EphA4 étant de loin le membre le plus fortement exprimé (Aoki et al., 2004; North et al., 2009). Des souris déficientes pour EphA4 et EphA7 présentent des défauts corticaux (Depaepe et al., 2005; North et al., 2009). La différentiation précoce et une dérégulation de l'apoptose sont les principales hypothèses avancées pour expliquer ces défauts. L'étude *in vivo* de la signalisation Eph-éphrine dans la neurogénèse embryonnaire se révèle techniquement délicate et complexe du fait de la multiplicité des membres exprimés et qui pourraient présenter des redondances de fonction. Ainsi il est par exemple nécessaire de cumuler la déficience simultanée des 3

Structure	Cell type	Family members: Receptor	Family members: Ligand	References
Neocortex	NPC	Eph A2	ephrin B1 ephrin B2 ephrin B3	(Aoki et al. 2004;[31] Del Valle et al. 2011[19])
		Eph A4		
		Eph B1		
		Eph B2		
		Eph B3		
		Eph B4		
		Eph B6		
	CP	Eph A2	ephrin A2	(North et al. 2009;[30] Aoki et al. 2004[31])
		Eph A3	ephrin A3	
		Eph A4	ephrin A4	
		Eph A5	ephrin A5	
		Eph A7	ephrin B1 ephrin B2 ephrin B3	
		Eph B1		
		Eph B3		
		Eph B6		
			ephrin A1	
	IZ	Eph A3	ephrin A1	(North et al. 2009[30])
		Eph A4	ephrin A2	
		Eph A7	ephrin A3	
		Eph B1	ephrin A4	
		Eph B2	ephrin A5	
		Eph B3	ephrin B1	
		Eph B6	ephrin B2	
	VZ	Eph A7	ephrin A2	(Stuckmann et al. 2001;[28] Qiu et al. 2008;[29] North et al. 2009;[30] Murai et al. 2010;[37] Arvanitis et al. 2013[44])
		EphA4	ephrin B1	
SVZ	NSC	Eph A7	ephrin B1 ephrin B2	(Aoki et al. 2004;[31] Ricard et al. 2006;[18] Holmberg et al. 2005;[23] Kodosecitch et al. 2011;[25] Conover et al. 2000[16])
		Eph A4		
		Eph B2		
	Transient amplifying cells	Eph B2	ephrin A2	(Holmberg et al. 2005;[23] Conover et al. 2000[16])
	astrocytes	Eph A7	ephrin B2/B3	(Conover et al. 2000;[16] Holmberg et al. 2005[23])
	SVZ	Eph A1	ephrin A2	(Conover et al. 2000;[16] Ricard et al. 2006;[18] Jing et al. 2012[47])
		Eph A2	ephrin A3	
		Eph A3	ephrin A5	
		EphA4		
		Eph A5		
		Eph A6		
		Eph A7		
		Eph A8		
		Eph B1		
		Eph B2		
		Eph B3		
		Eph B4		
		Eph B6		
	lateral ventricle	Eph B1		(Conover et al. 2000[16])
		Eph B2		
	border SVZ		ephrin B3	(Ricard et al. 2005[18])
SGZ	NSC	EphB4	ephrin B1	(Ashton et al. 2012[22])
		Eph A4	ephrin A5	(Kodosecitch et et. 2011[25])
				(Chumley et al. 2007[20])
				(Hara et al. 2010[26])
	Dentate Gyrus		ephrin B1	(Catchpole et al. 2011[21])
	Astrocytes	Eph A4	ephrin A2	(Jiao et al. 2008;[24] Ashton et al. 2012;[22] Kodosecitch et. 2011[25])
			ephrin A3	
			ephrin B2	
	Mature granule neurons		ephrin A5	(Hara et al. 2010[26])

Figure 24 : Expression des membres de la famille des Ephs:éphrines dans la neurogénèse
D'après Laussu J. et al, Cell adhesion and migration, 2014

éphrines B1, B2 et B3 pour voir apparaitre un phénotype de défaut de migration neuronale dans le cortex embryonnaire chez la souris (Senturk et al., 2011). L'expression des ligands et récepteurs durant la neurogénèse embryonnaire est pour partie listée dans la figure 24.

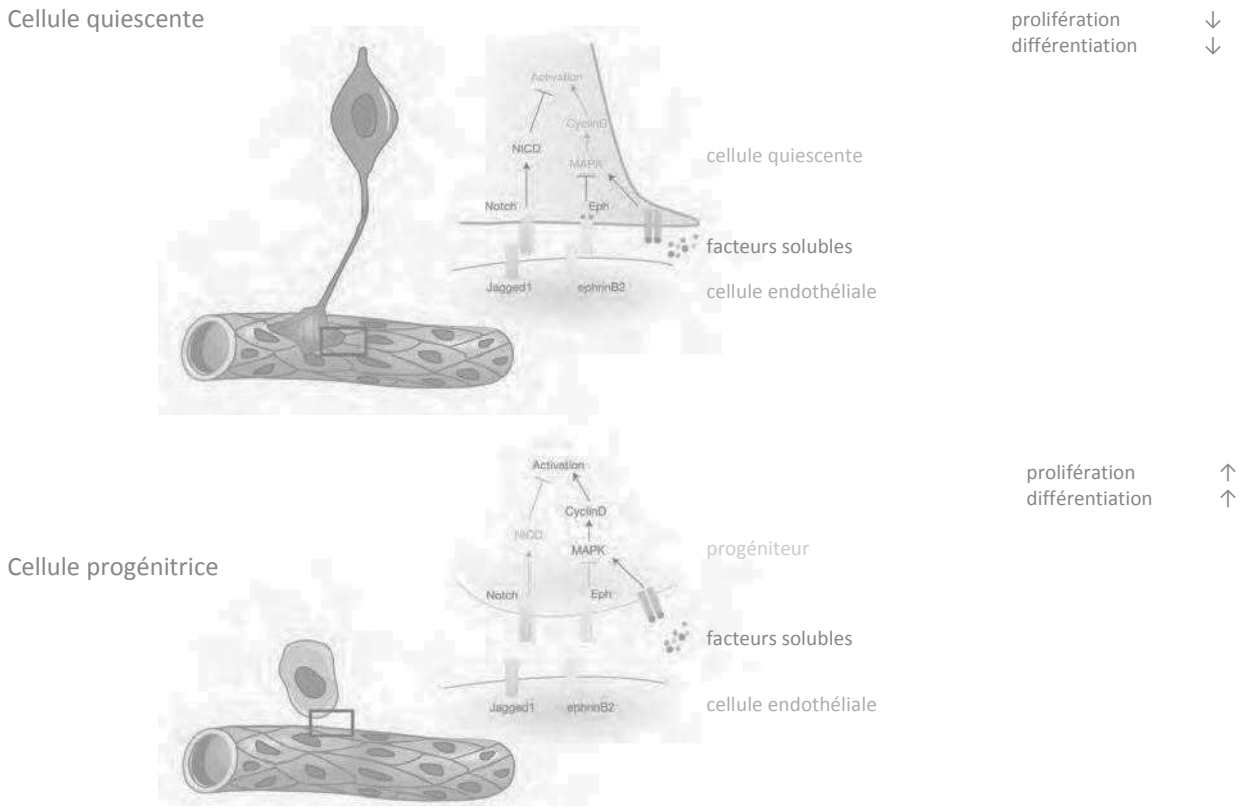
2.5.2 Dans l'organisme adulte

2.5.2.1 Dynamique des cellules souches

Il existe au sein de l'organisme des régions que l'on appelle des niches, au sein desquelles sont séquestrées des cellules souches. Ce regroupement de cellules souches peut alors être mobilisé par l'organisme pour assurer le maintien de l'homéostasie tissulaire ou la régénération du tissu. Durant ces dix dernières années, les Eph-éphrines sont apparus comme des candidats potentiels dans la régulation de la balance entre maintien des cellules souches quiescentes et activation de leur prolifération-différentiation. Par exemple dans les cryptes intestinales, les récepteurs EphB2 et EphB3 ainsi que le ligand éphrineB1, déjà impliqués durant l'embryogénèse, sont également nécessaires au maintien des cellules souches dans la niche par formation de gradients d'expression (Holmberg et al., 2006). Un rôle de la signalisation Eph-éphrine a également été proposé au sein de la niche hématopoïétique, les cellules souches hématopoïétiques exprimant éphrineA3, éphrineA4, EphA1, EphA2, EphB2 et EphB4 (Lazarova et al., 2006). EphrineB2 est lui exprimé de manière complémentaire par les cellules stromales de la moëlle osseuse (Suenobu et al., 2002). Ainsi il a été montré que le couple éphrineB2-EphB4 régule le détachement des cellules souches de la niche et leur différentiation. De manière similaire, les couples éphrineA2-EphA2 et éphrineB2-EphB4 régule la dynamique des ostéoblastes, cellules souches à l'origine des tissus osseux (Irie et al., 2009; Zhao et al., 2006a).

2.5.2.2 Neurogénèse adulte

Dans la neurogénèse adulte, il existe une niche appelée zone sous ventriculaire (SVZ) qui héberge des cellules souches capables de générer de nouveaux neurones. Les cellules de cette niche expriment les ligands éphrineB1 à B3 ainsi que les récepteurs EphB1 à B4 et EphA4 (figure 24) (Conover et al., 2000; Khodosevich et al., 2011). Un contrôle direct de la signalisation Eph-éphrine sur la prolifération des cellules souches neurales a été démontré



<u>Figure 25</u> : Eph-éphrine dans la neurogénèse adulte
Modèle du contrôle de la quiescence des cellules souches neurales dans la niche sous ventriculaire. L'éloignement des cellules progénitrices vis-à-vis des cellules endothéliales permet l'extinction de la voie Eph-éphrine et la levée d'inhibition de la prolifération et de la différentiation. *Adapté d'après Ottone C. et al., NCB, 2014.*

par l'utilisation de ligand soluble *in vitro* (Katakowski et al., 2005). La souris adulte déficiente pour EphB1 et EphB2 présente des défauts corticaux et notamment une réduction du nombre de neurones du gyrus denté (Chumley et al., 2007). De plus, il a été démontré que le ligand éphrineB2 exprimé par les astrocytes dans l'environnement immédiat de cellules souches de la SVZ, active le récepteur EphB4 et induit la différentiation de ces cellules souches en neurones (Ashton et al., 2012). Comme pour d'autres fonctions biologiques des Eph-éphrines, certaines études proposent des rôles opposés pour cette signalisation dans la neurogénèse adulte (Jiao et al., 2008). Enfin il a dernièrement été décrit un rôle de l'expression d'éphrineB2 par les cellules endothéliales irriguant la niche capable de réguler par contact direct l'état de quiescence des cellules souches qui la composent (figure 25) (Ottone et al., 2014). Les différentes réponses cellulaires semblent également très dépendantes du contexte environnemental et impliquent l'activation de voies distinctes en aval de cette signalisation comme par exemple l'inhibition ou l'activation de la voie MAPK (Jiao et al., 2008; Nomura et al., 2010). Pour une revue récente sur le rôle des Eph-éphrines dans la neurogénèse voir (Laussu et al., 2014).

2.5.2.3 Fonctionnement synaptique

Les récepteurs de type Bs et leurs ligands ont été impliqués dans le fonctionnement synaptique et les capacités cognitives qui en découlent (Henkemeyer et al., 2003). Des souris déficientes pour éphrineB1 présentent des capacités d'apprentissage réduites (Arvanitis et al., 2014), tout comme des souris déficientes pour éphrineB2 et éphrineB3 (Bouzioukh et al., 2007; Rodenas-Ruano et al., 2006). De plus, chez l'homme, certains individus présentant des mutations sur le gène éphrineB1 ont également des retards mentaux associés (Wieland et al., 2004). Des approches *in vitro* ont démontrées que l'expression des éphrines pouvait réguler la morphologie des synapses et leur maturation (Ethell and Ethell, 2007; McClelland et al., 2009). Cette altération de morphologie des synapses a d'ailleurs été confirmé *in vivo* dans une publication de l'équipe (Arvanitis et al., 2014). Les souris déficientes pour la protéine éphrineB1 ne présentent pas, à l'âge adulte, de défaut du nombre de neurones corticaux mais présentent des déficits de branchements de ces neurones, un déficit du nombre de dendrites et une sur-représentation dans la proportion de dendrites immatures, génralement considérées comme peu-fonctionnelles. Le récepteur EphA7 a également été décrit comme contrôlant la taille et la forme des dendrites tout comme la fonctionnalité de la synapse (Clifford et al., 2014). Cependant l'activité kinase des récepteurs ne serait pas

nécessaire dans le fonctionnement synaptique (Soskis et al., 2012). Pour une revue récente sur le rôle des Eph-éphrines au niveau des synapses voir ((Hruska and Dalva, 2012)).

2.5.2.4 Dans la tumorigénèse et l'agressivité des cancers

De très nombreuses études ont établies un lien entre les niveaux d'expression des Ephs et des éphrines et l'apparition ou la progression des cancers. En effet l'expression des récepteurs Ephs est généralement diminuée dans les tissus adultes comparativement aux tissus embryonnaires (Lickliter et al., 1996) et il semble que la re-émergence de cette expression dans les cancers soit un marqueur de mauvais pronostic.

Les récepteurs EphA1, A2 et B4 tout comme les ligands éphrine-A1, A5 et B1 sont surexprimés dans les cancers des ovaires (Herath et al., 2006). Dans les tumeurs solides du pancréas ce sont tous les récepteurs EphAs, à l'exception d'EphA8 et A10 qui sont surexprimés (Giaginis et al., 2010). Dans les cancers du colon, la situation est plus complexe vis-à-vis de l'expression des récepteurs Ephs. Ainsi EphA2 et A4 sont sur-exprimés, EphA1, A6, A7 et A8 sont sous-exprimés et EphB1, B2, B3 et B4 sont tantôt sous-exprimés, dans le cas des adénomes notamment, tantôt sur-exprimés dans le cas des carcinomes (Batlle et al., 2005; Liu et al., 2002b). Cette dichotomie d'expression existe également dans les cancers du sein, des poumons et des glioblastomes en fonction des stades tumoraux (pour une revue exhaustive et l'expression des éphrines dans le cancer voir (Brantley-Sieders, 2012)).

Les récepteurs Ephs peuvent donc être considérés alternativement comme des promoteurs de tumeurs ou des suppresseurs de tumeurs, en fonction du contexte environnemental. Par exemple , au sein de l'épithélium intestinal, le récepteur EphB2 peut promouvoir la prolifération cellulaire via Abl-CyclinD1 mais également inhiber la motilité cellulaire et la diffusion des métastases via Pi3kinase (Genander et al., 2009). De plus, la variation de l'expression des récepteurs membranaires a également une incidence sur la signalisation reverse, en aval du ligand, ce qui ajoute encore à la complexité du rôle de la voie Eph-éphrine dans les cancers. D'une manière générale les récepteurs Ephs sont impliqués dans l'agressivité des cancers en facilitant la vascularisation des tumeurs (pour une revue sur le rôle des éphrines dans la vascularisation des tumeurs voir (Hess et al., 2007)) et en accélérant la diffusion des métastases (pour une revue sur le rôle des éphrines dans l'invasion des cellules tumorales voir (Kandouz, 2012)). La vascularisation de la tumeur permet non seulement d'apporter les nutriments et l'oxygène nécessaires à la prolifération

cellulaire mais elle permet également de créer un réseau de diffusion pour les cellules métastatiques. Le couple éphrineB2-EphB4 est largement impliqué dans cette néovascularisation tumorale qui semble dépendante de la signalisation reverse induite par la fixation du récepteur (Martiny-Baron et al., 2004). Ainsi la transplantation de cellules de gliomes dans des cerveaux de souris déficientes pour éphrine-B2, aboutit à la formation de tumeurs faiblement vascularisées et plus petites comparativement aux tumeurs obtenues dans les souris sauvages (Sawamiphak et al., 2010). La diffusion des métastases est également facilitée par la dérégulation directe des mécanismes d'adhésion et de motilité cellulaire. Par exemple, le récepteur EphA2 activé forme un complexe avec la kinase Src qui phosphoryle la kinase FAK responsable du maintien de l'adhésion. Ceci aboutit à une modification des propriétés contractiles de la cellule via l'actine et la myosine, un arrondissement des cellules et des capacités migratoires accrues facilitant la diffusion des cellules tumorales dans l'organisme (Parri et al., 2007). La phosphorylation du récepteur EphB2 régule également la migration et les propriétés invasives des cellules dans les tumeurs du cerveau, en partie via l'activation de FAK mais aussi via la régulation de l'intégrine (Nakada et al., 2004; Wang et al., 2012). A l'inverse, l'activation du récepteur EphB1 dans ces mêmes types de tumeurs inhibe les propriétés invasives des cellules et corrèle avec un meilleur pronostic pour les patients (Teng et al., 2013). C'est également le cas pour le récepteur EphA8. Lorsque son expression est inhibée, par des microARNs ou des siRNA, les propriétés migratoires et invasives des cellules sont augmentées dans les glioblastomes et diverses lignées de gliomes (Yan et al., 2015). Le récepteur EphA8, en tant que suppresseur de tumeur, serait d'ailleurs capable de prévenir la transition épithélio-mésenchymateuse qui contribue à l'apparition des cellules cancéreuses de gliomes dans le cerveau (Yan et al., 2015). Clairement il apparait qu'une des fonctions principales de la signalisation Eph-éphrine dans les cancers et surtout l'agressivité des glioblastomes est de réguler les propriétés invasives et migratoires des cellules. Dernièrement un rôle de la signalisation Eph-éphrine a également été décrit dans la dédifférenciation des cellules tumorales faisant de cette voie de signalisation non plus un relais dans les processus cancéreux mais une source d'initiation tumorale. C'est le cas des récepteurs EphA2 et EphA3 capables d'induire la formation de glioblastomes (Binda et al., 2012; Day et al., 2013; Miao et al., 2014). C'est aussi vrai pour le récepteur EphB2 qui facilite la formation de sphères tumorales *in vitro* et présente des propriétés tumorigènes *in vivo* (Gao et al., 2014). Ce même récepteur est également repsonsable de la capacité des cellules souches neurales issus d'un modèle murin pour le cancer de l'épendyme (tumeurs primaires du système nerveux central) à générer des tumeurs (Chen et al., 2015). Les auteurs ont décrit que

l'activation et la signalisation kinase du récepteur EphB2 induit la formation de sphères tumorales à partir de cellules souches neurales en culture. De plus, ces cellules souches neurales surexprimant le récepteur EphB2 ou le récepteur EphB2 dépourvu de domaine SAM/liaison PDZ sont capables d'induire des tumeurs *in vivo* dans 100% des xénogreffes intracraniennes. Les mêmes cellules surexprimant un récepteur dépourvu de domaine de liaison aux ligands ou de domaine d'activité kinase ne sont pas capables d'induire ces tumeurs dans le même contexte (Chen et al., 2015).

Aussi, la voie Eph-éphrine est aujourd'hui devenue à la fois un marqueur biologique de pronostic et une cible thérapeutique dans la lutte contre le cancer. La phosphorylation du récepteur EphA2 sur un résidu sérine spécifique est utilisée comme biomarqueur dans les glioblastomes et des approches d'immunothérapie visant ce récepteur ont déjà été tentées chez la souris (Chow et al., 2013; Miao et al., 2015).
Le récepteur EphB2 à également récemment attiré l'attention pour des stratégies thérapeutiques dans les glioblastomes. Des approches d'extinction par ARN interférence ont démontrées qu'il était possible de limiter l'agressivité de ces tumeurs (Wang et al., 2012). Cependant, les mêmes auteurs décrivent qu'EphB2 limite les capacités prolifératives de ces cellules tumorales et qu'une extinction du récepteur facilite leur multiplication, invitant à prendre des précautions quant à une utilisation de cette approche dans le domaine thérapeutique (Wang et al., 2012). Ce dernier exemple démontre toute la difficulté des stratégies à élaborer lorsque l'on cible directement les Eph-éphrines dans la lutte anti-tumorale. La compréhension des cascades moléculaires en aval de ces signalisations qui semblent orchestrer la dichotomie des effets biologiques potentiels, est donc une urgence. Pour une revue récente sur les cibles thérapeutiques des récepteurs Ephs dans les glioblastomes voir (Day et al., 2014).

3. Une notion récente : l'environnement influence la division cellulaire

Au sein d'un tissu la cellule doit pouvoir se diviser dans un environnement où elle subit de multiples contraintes. Dans un épithélium ces contraintes sont plus aigues encore car les cellules sont en contacts étroits au sein d'un tissu polarisé. Cet attachement aux cellules voisines doit être assoupli pour permettre les remodelages architecturaux durant la mitose sans que le contact ne soit totalement rompu pour préserver l'architecture du tissu. De plus, la cellule doit pouvoir conserver sa polarité durant sa division et maintenir la fonctionnalité tissulaire.

L'hypothèse de signaux coordonnant la division des cellules au sein d'un tissu est apparue avec la découverte de l'inhibition de contact par Abercrombie (Abercrombie, 1967). Au sein d'un épithélium ou d'une boite de pétri, les cellules normales cessent de se diviser lorsque elles sont en contact étroits. A contrario si l'on rompt ces contacts cellulaires par dilution de la concentration des cellules, leur division est stimulée (Carter, 1968). Des plaques denses aux électrons au niveau des points de contacts des cellules laissent supposer l'existence de complexes moléculaires qui agiraient comme des verrous. Ces complexes moléculaires ont depuis été largement étudiés et l'on connait notamment le rôle primordial de la E-cadherin, des jonctions adhérentes, et de la voie Hippo-YAP/TAZ, dans l'inhibition de la division cellulaire (Eisenhoffer and Rosenblatt, 2013). Des zones d'incompréhension existent encore largement sur les relais de ces contacts cellulaires leur permettant de contrôler la division des cellules. L'émergence du rôle des forces de tension et de l'interaction avec le cytosquelette semble aujourd'hui une voie intéressante (Puliafito et al., 2012). En sus, la notion d'environnement semble également un élément clé dans la régulation de la division cellulaire. Ainsi il est remarquable que les cellules mitotiques soient souvent regroupées entre elles dans des zones délimitées au sein d'un tissu, particulièrement chez l'adulte. Ces zones qui hébergent ces cellules souches sont appelées « niches ». L'expression de molécules particulières au sein de ces niches permettrait aux cellules en division de rester séquestrées dans cet environnement favorable mais également d'orienter leur mode de division (Marthiens et al., 2010).

3.1 Implication des jonctions cellulaires

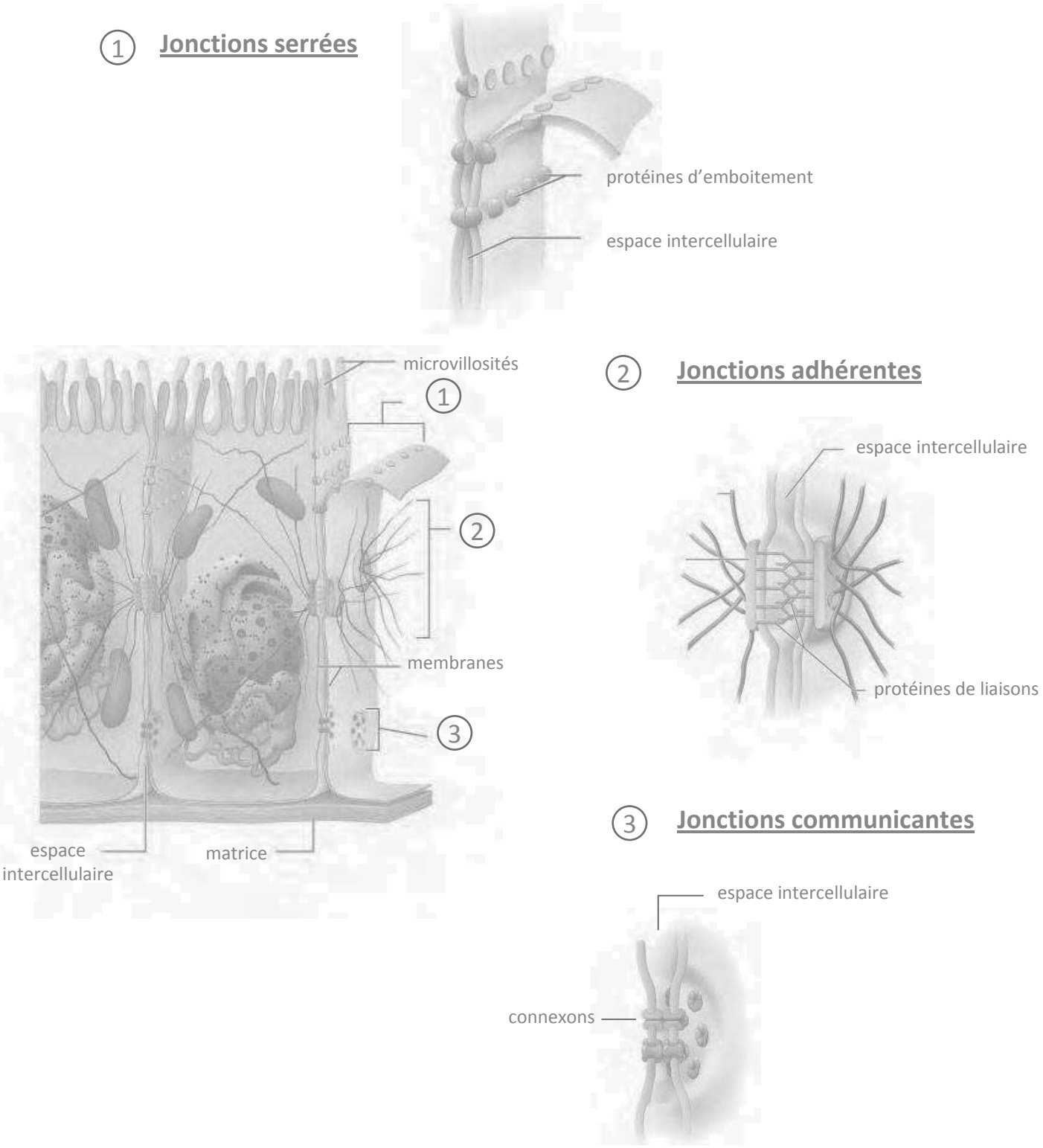


Figure 26 : Les jonctions cellulaires
Voir texte pour détails
Adapté d'après Cummings Benjamin, Pearson education, 2004.

La structure et la fonction d'un épithélium sont étroitement liées à la polarisation des cellules qui le composent. Cette polarité est la résultante de la répartition de jonctions cellulaires le long de l'axe apico-basal des cellules et qui définissent en conséquence un enrichissement diversifié en domaines lipidiques et protéiques selon ce même axe (Cavey and Lecuit, 2009). Les cellules épithéliales ont la particularité de pouvoir se diviser en orientant leur fuseau mitotique par rapport à cet axe de polarité apico-basale. Une division planaire, parallèle à cet axe, engendrera deux cellules-filles avec une polarité et un positionnement dans le tissu similaires à la cellule-mère alors qu'une division orthogonale, perpendiculaire à cet axe, génèrera deux cellules-filles avec un positionnement tissulaire et une polarité initialement différents de la cellule mère. C'est cette dernière originalité qui permet l'existence de division asymétriques au sein des épithéliums stratifiés ou pseudo-stratifiés.

Il existe trois grands types de jonctions cellulaires (figure 26) : les jonctions serrées (TJs) ou « zonula occludens » capables de limiter la perméabilité de l'épithélium, les jonctions adhérentes (AJs) ou « zonula adherens », qui permettent l'attachement mécanique des cellules entre elles, et les jonctions communicantes (GJs), «macula communicans», qui permettent la diffusion de signaux chimiques ou électriques entre les cellules.

3.1.2 Les jonctions serrées

Les jonctions serrées sont les jonctions les plus apicales des cellules épithéliales et responsables de l'étanchéité membranaire. Elles sont composées de trois protéines transmembranaires - occludine, claudine et JAM - liées à des protéines intracellulaires ZO-1 et ZO-2 capables d'interagir avec le cytosquelette d'actine. Il existe très peu d'études sur le rôle et la dynamique des jonctions serrées au cours de la division cellulaire et il semble que la persistance de ces jonctions n'entrave pas le déroulement de la division cellulaire malgré les forts remodelages cellulaires. *In vitro* les composants des jonctions serrées sont présents à l'interface des cellules tout au long du déroulement de la mitose (Jinguji and Ishikawa, 1992; Kojima et al., 2001) et les cellules de l'épithélium intestinal de souris effectuent leur division alors que les jonctions serrées sont maintenues (Jinguji and Ishikawa, 1992). Dans un modèle d'hépatocytes murins en culture les protéines occludine et claudine sont détectées dans le midbody durant la cytocinèse alors que les protéines ZO-1 et ZO-2 en sont exclues. Ces dernières sont concentrées en périphérie du midbody ce qui laisse supposer un possible

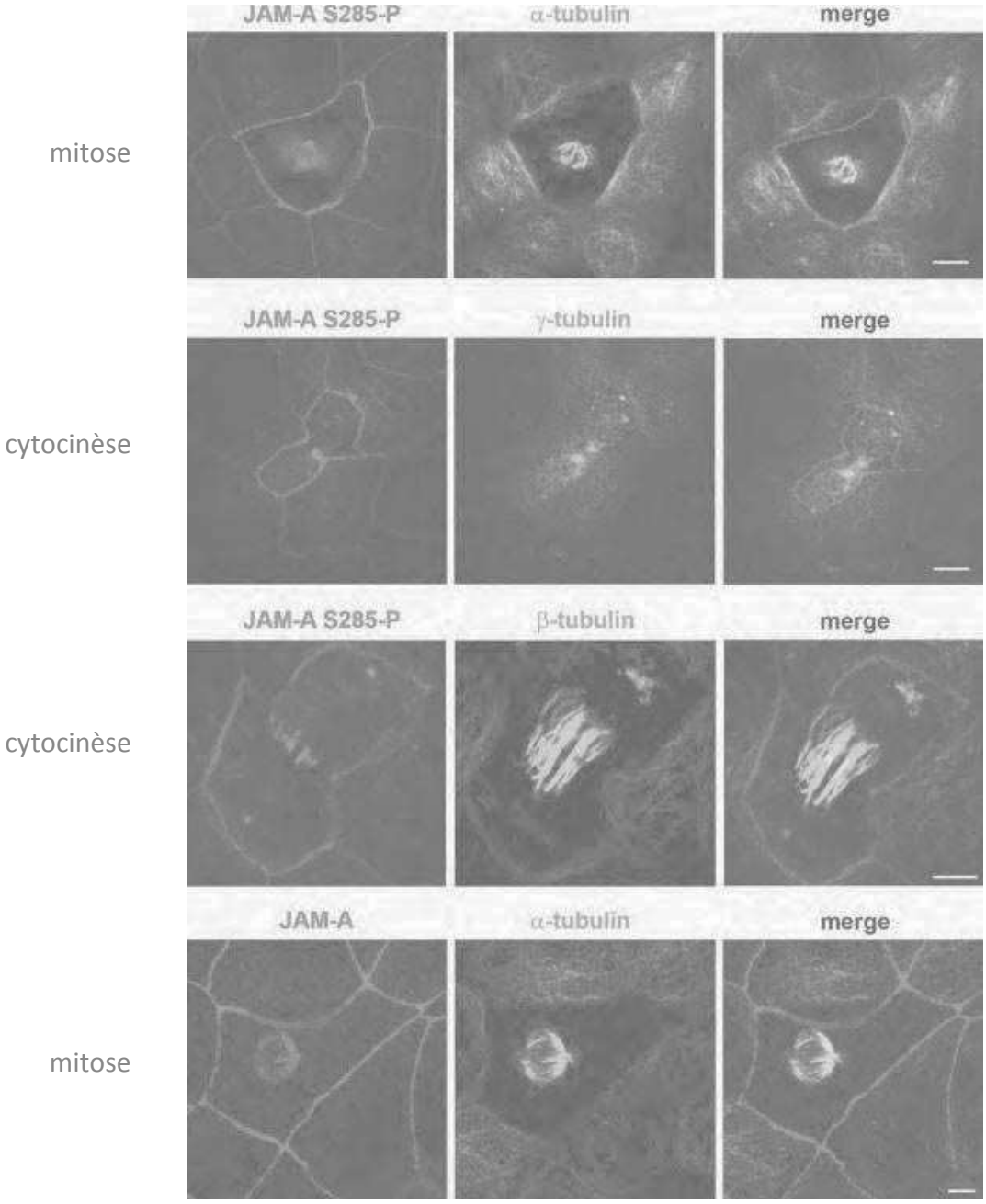


Figure 27 : Réorganisation des jonctions serrées durant la mitose et la cytocinèse
Cellules MTD-1A confluentes. La phosphorylation de la protéine JAM sur Ser285 est fortement augmentée durant la mitose et la cytocinèse. Des réorganisations des jonctions sérrées sont visibles au niveau du pont intercellulaire durant la ytocinèse.
Adapté d'après Iden S. et al, J Cell Biol., 2012

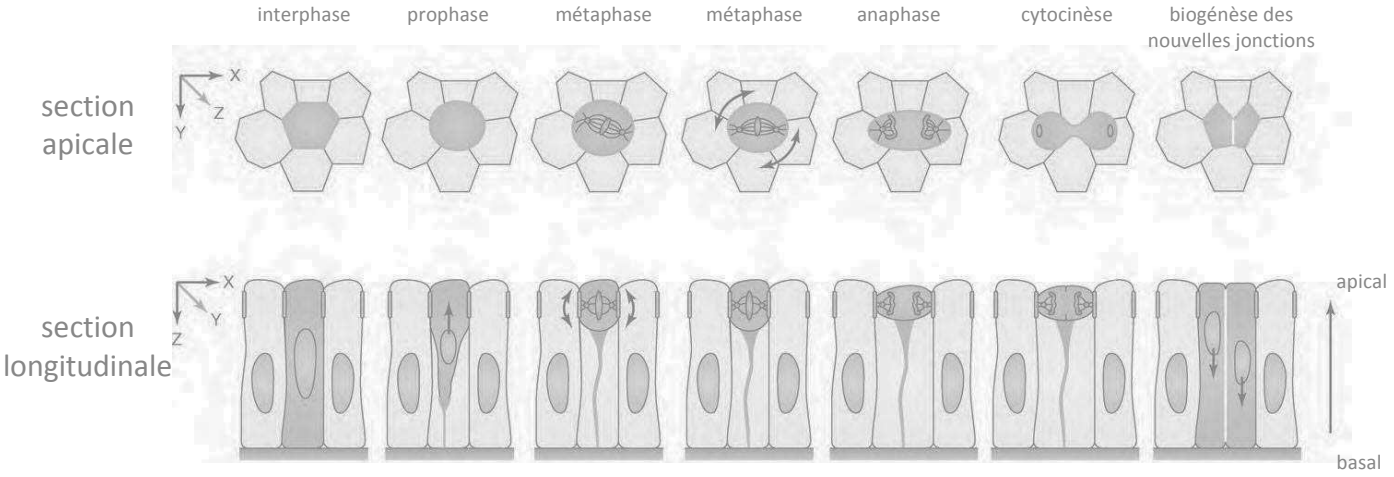
découplage des interacteurs au sein des jonctions serrées en fin de télophase pour permettre la réalisation de la cytocinèse (Kojima et al., 2001). Les protéines ZO sont également capables de séquestrer directement CyclineD1 au niveau des jonctions serrées et ainsi prévenir sa protéolyse, permettant aux cellules de progresser vers la phase-S du cycle cellulaire (Capaldo et al., 2011). Enfin une étude récente a démontré qu'un membre de la famille des PKC (PKCa) est capable d'hyperphosphoryler durant la mitose la protéine JAM (figure 27). Cette phosphorylation régule la maturation des contacts cellule-cellule permettant de proposer une dynamique supplémentaire des jonctions serrées durant la division cellulaire (Iden et al., 2012).

3.1.3 Les jonctions communicantes

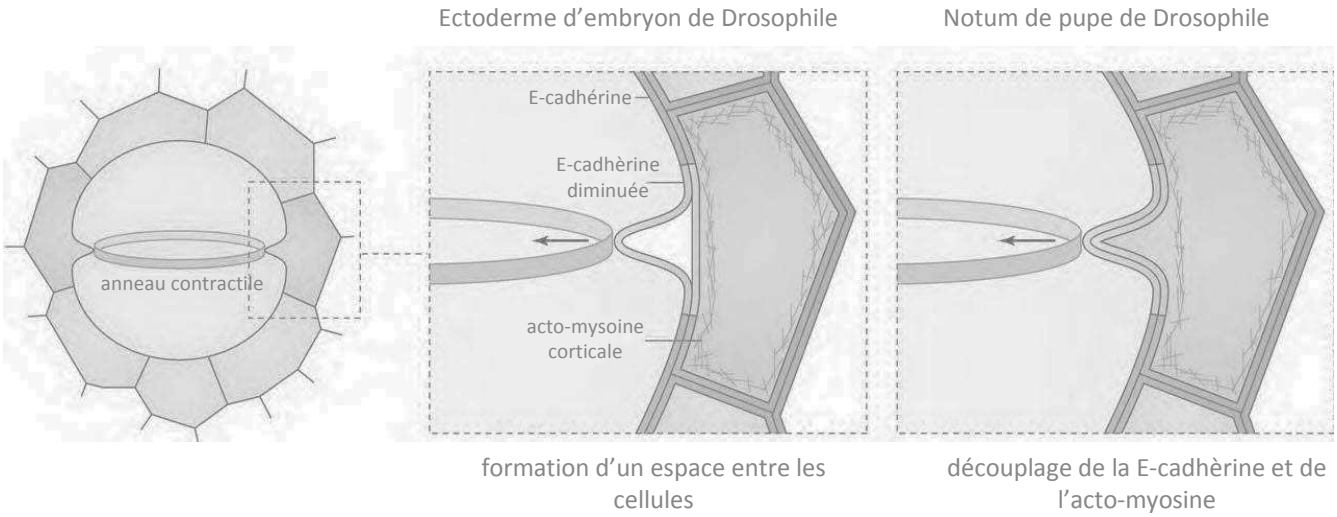
Les jonctions communicantes préférentiellement situées en partie plus basale des cellules polarisées permettent la diffusion de molécules et de signaux électriques entre deux cellules voisines par constitution de canaux. Ces canaux sont composés de connexons, tétramères de protéines transmembranaires, les connéxines. Parmi ces protéines la connéxine 43 est la plus abondamment présente au sein des jonctions communicantes. Il a été décrit que la phosphorylation de la connéxine43 varie en fonction du cycle cellulaire (Solan et al., 2003) et que l'activité de la PKC, via la phosphorylation de la connéxine43, bloque la progression en phase-S (Kardami et al., 2003). Le nombre de jonctions communicantes est également réduit durant les phases S et G2/M comparativement aux mêmes cellules en interphase (Kardami et al., 2003; Stein et al., 1992). Récemment une étude a détaillé la dynamique des jonctions communicantes durant les phases du cycle cellulaire et notamment décrit une redistribution intracellulaire des connexons en mitose puis une réapparition de connéxine43 en télophase au niveau de l'anneau de clivage et en périphérie du midbody (Boassa et al., 2010). Cependant le rôle de la connexine43 dans la division cellulaire semble indépendant de sa fonction dans les jonctions communicantes. En effet la surexpression de connéxine43 dans des cellules HeLa semble suffisante pour altérer la progression à travers le cycle cellulaire mais pas l'inhibition pharmacologique de la communication via les jonctions communicantes (Johnstone et al., 2010).

3.1.4 Les jonctions adhérentes

a



b



<u>Figure 28</u> : Modèle de division planaire des cellules épithéliales et des réarrangements des jonctions adhérentes
a- Progression à travers le cycle cellulaire au sein d'un épithélium polarisé.
b- Réarrangements des jonctions adhérentes et de la E-cadhèrine durant la cytocinèse.
Adapté d'après Ragkousi K. et al., JCB, 2014

Récemment le rôle des jonctions adhérentes dans la division cellulaire a été décrit dans plusieurs études sur la division cellulaire *in vivo*. La majorité d'entres elles ont été réalisées chez l'organisme modèle de Drosophile.

Les jonctions adhérentes assurent la rigidité tissulaire faisant un lien entre le cytosquelette d'une cellule et celui de la cellule voisine. Des protéines transmembranaires, les cadhérines et notamment la E-cadhérine, interagissent de part et d'autre des cellules adjacentes via leur domaine extracellulaire. Ces molécules de cadhérines sont reliées par leur domaine intracellulaire au cystosquelette d'actine et de microtubules via des molécules de caténine (alpha-caténine, beta-catnénine, p120caténine) (Meng and Takeichi, 2009).

Plusieurs études ont décrit le maintien des jonctions adhérentes durant la division cellulaire ce qui parait pourtant être une contrainte architecturale forte durant un processus qui nécessite des changements de morphologie extrêmes (Founounou et al., 2013; Morais-de-Sa and Sunkel, 2013). Cette persistance de jonctions adhérentes est indispensable au maintien de la polarité cellulaire et tissulaire, indispensable à la cohésion et la fonctionnalité du tissu chez tous les organismes modèles (Krawchuk et al., 2015; Liu et al., 2014; Yang et al., 2015). Cette contrainte pour la cellule en tant qu'individu est donc exploitée par le tissu, à son propre profit, pour le maintien de son intégrité et de sa fonctionnalité (figure 28a) (Herszterg et al., 2014; Ragkousi and Gibson, 2014).

Ainsi, il a été décrit par imagerie en temps réel que la progression des cellules épithéliales de Drosophile à travers la division cellulaire s'accompagne d'une diminution de l'expression de E-cadhérine au niveau du fuseau membranaire durant la cytocinèse (Founounou et al., 2013; Guillot and Lecuit, 2013; Herszterg et al., 2013; Morais-de-Sa and Sunkel, 2013). Cette diminution traduit un découplage extrêmement localisé et temporaire des jonctions adhérentes pour permettre la création d'une nouvelle interface entre les cellules voisines (figure 28b). Dans l'embryon de Drosophile ce découplage aboutit à la formation d'un espace entre les membranes des cellules filles (Guillot and Lecuit, 2013) alors que dans la région dorsale de la pupe de Drosophile l'anneau contractile de la cellule en division entraine avec lui la membrane plasmique de la cellule (Herszterg et al., 2013). Les molécules de Septines et d'Anilline joueraient un rôle dans ce découplage des jonctions adhèrentes comme l'indique les retards de divisions observés dans les embryons mutants pour Septine (peanut) et Anilline (Founounou et al., 2013; Guillot and Lecuit, 2013). Le rôle de Septine apparait cependant restreint aux divisions planaires, les cellules déplétées en Septine et se divisant selon un axe orthogonal pouvant achever leur division (Founounou et al., 2013; Menon and Gaestel, 2015). Chez les mammifères la déstabilisation de p120caténine par ARN

interférence dans des cellules humaines de cornée facilite la division cellulaire sans modifier l'expression à l'interface membranaire de N-cadhèrine et ZO-1, laissant également supposer l'existence d'un découplage régulé des molécules composant les jonctions adhérentes, durant la mitose (Zhu et al., 2012). De plus, une équipe a récemment démontrée que les jonctions adhérentes assurent le positionnement apical du midbody dans un épithélium stratifié chez la Drosophile confirmant un lien entre jonctions adhérentes et cytocinèse (Morais-de-Sa and Sunkel, 2013). Ces auteurs ont décrit que le positionnement du midbody se fait indépendamment du positionnement et de la contraction de l'anneau de clivage, affaiblissant l'hypothèse d'un contrôle exclusivement intrinsèque de la cytocinèse. En délocalisant artificiellement des jonctions adhérentes ils délocalisent le positionnement du midbody dans les cellules du follicule et induisent des invaginations ectopiques de l'épithélium (Morais-de-Sa and Sunkel, 2013). Il existe donc clairement une dynamique des jonctions adhèrentes indispensable durant la division cellulaire et particulièrement la cytocinèse qui permettrait à la cellule de se diviser en intégrant les contraintes tissulaires.

3.2 Implication des interactions avec la matrice

L'environnement cellulaire est également composé de molécules sécrétées par les cellules et qui constituent une matrice interstitielle entre les cellules adjacentes au sein d'un tissu ou une membrane basale sur laquelle repose les épithéliums : la matrice extracellulaire (ECM)(Frantz et al., 2010). Les composants de la matrice extracellulaire, protéoglycans, acide hyaluronique, fibres de collagène, d'élastine, fibronectine et laminine sont tous en contact avec une famille de molécules de la membrane plasmique, les Intégrines. Les hétérodimères d'intégrine au-delà de leur propriété d'adhésion et d'interaction avec le cytosquelette d'actine et de microtubules relaient l'information de la matrice extracellulaire, au travers de la membrane plasmique, à des effecteurs intracellulaires. Parmi ces acteurs intracellulaires l'on retrouve des tyrosines kinase cytoplasmiques comme FAK et Src, la kinase PI3kinase qui régule l'activité des phosphatidylinositols membranaires et des membres de la famille des petites GTPases, notamment RhoA, Rac1, CDC42, Arf6 et Rab21.

Un lien entre l'attachement de la cellule et la progression dans la division cellulaire a été décrit depuis le début des années 80 (Ben-Ze'ev and Raz, 1981; Ishii, 1980; Winklbauer, 1986). Les auteurs ont alors observé qu'un défaut d'attachement des cellules induit l'apparition de cellules bi-nuclées par défaut de cytocinèse. Une étude détaillée à l'aide de fibroblastes primaires humains a confirmée que les cellules progressent jusqu'en anaphase

mais ne peuvent réaliser ni l'invagination du fuseau ni l'abscission si elles sont cultivées en suspension (Thullberg et al., 2007). Un lien direct entre la matrice extracellulaire et l'orientation du fuseau mitotique a été décrit dans des cellules HeLa cultivées sur des supports recouverts de fibronectine, interacteur des intégrines (Thery et al., 2005). En faisant varier la forme du tapis de fibronectine, les auteurs influencent la dynamique de l'actine membranaire en interphase et la ségrégation des composants corticaux. Cette information est conservée par la cellule jusqu'en mitose, lorsque les contacts avec le support sont minimisés du fait de l'arrondissement de la cellule, et influe sur le positionnement de l'axe de division. Ce rôle de l'intégrine dans le positionnement du fuseau mitotique a été confirmé *in vivo* dans l'épiderme de souris (Lechler and Fuchs, 2005) puis chez C.elegans (Vogel et al., 2011). En outre, des mutations dans la partie cytoplasmique des intégrines et la délétion de l'intégrine endogène induit des défauts de cytocinèse par rupture de l'interaction avec le cytosquelette de la cellule en division (Reverte et al., 2006). Les kinases ERK, RSK et ILK ont été identifiés comme des acteurs potentiels des défauts d'abscission en aval des intégrines dans des cellules humaines tumorales (Mathew et al., 2014; Sikkema et al., 2014). Ainsi, dans des cellules CHO, la mutation du domaine intracytoplasmique de l'intégrine-beta1 et l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques induit des défauts de cytocinèse et des cellules bi-nuclées. Ces défauts peuvent être sauvés par l'utilisation de formes contitutivement actives de ERK ou RSK (Mathew et al., 2014). Chez la souris, la dérégulation des intégrines de cellules non-transformées est suffisante pour induire un processus de tumorigénèse par xénogreffes avec une sur-représentation de cellules aneuploïdes au sein de la tumeur néo formée (Hognas et al., 2012).

3.3 Implication des forces de contact

Le contrôle de la division cellulaire par l'environnement peut également s'exercer par les forces de tensions que subit la cellule au sein de l'épithélium. L'arrondissement de la cellule durant la mitose a été observé depuis longtemps et semble conservé parmi de multiples organismes (Cadart et al., 2014). Cet arrondissement cellulaire durant la mitose apparait indispensable à la formation du fuseau mitotique. En utilisant des chambres de constriction empéchant des cellules HeLa de s'arrondir une équipe a décrit que les cellules ne progréssent pas normalement en mitose, présentent des défauts de capture des chromosomes et d'assemblage du fuseau mitotique (Lancaster et al., 2013). L'arrondissement cellulaire en mitose modifie également la tension corticale des cellules

mitotiques et la pression intracellulaire (Fischer-Friedrich et al., 2014). Récemment une équipe a clairement démontrée *in vitro* dans des celules HeLa que les forces de tensions exercées par l'environnement cellulaire régulent la progression de la division cellulaire et en particulier l'abscission (Lafaurie-Janvore et al., 2013). Cette étude *in vitro* est soutenue par une étude *in vivo*, dans l'organisme modèle de Drosophile (Founounou et al., 2013). Par l'utilisation de Drosophile déficientes pour septine (peanut) et observation par imagerie en temps réel de la divison des cellules de l'épithélium les auteurs ont confirmé la nécéssité du maintien des jonctions adhérentes entre une cellule mitotique et les cellules voisines en interphase durant la division cellulaire et proposent eux aussi qu'un relâchement local des forces de tensions dans les divisions planaires soit nécessaire à l'achèvement de la division (Founounou et al., 2013).

3.4 Implication des récepteurs à tyrosines kinases

Relativement peu d'études se sont intéressées au rôle des récepteurs à tyrosine kinase (RTKs) dans la division cellulaire et plus particulièrement la cytocinèse malgré le fait que nombre de ces RTKs soient dérégulés dans les cancers. Il a été décrit que le récepteur à EGF (EGFR) pouvait réguler la cytocinèse dans des cellules tumorales via la phosphorylation de la pyruvate kinase 2 (PKM2) et de la MyosineII (Jiang et al., 2014). Pourtant l'activité d'EGFR était jusqu'à récemment considérée comme inhibée durant la mitose. En réalité l'activité d'EGFR serait bien présente, comme en atteste une étude qui a validé la phosphorylation d'EGFR durant les phases de la mitose (Wee et al., 2015) . Par contre, l'activation de certaines voies en aval d'EGFR serait modulée différemment entre l'interphase et la mitose (Wee et al., 2015). EGFR serait néanmoins capable d'activer durant la mitose c-Src, Fyn, Lyn, c-Cbl, c-Abl, PI3K et PLC-y1 (Feng et al., 2012; Wee et al., 2015), beaucoup de ces acteurs moléculaires étant capables d'intervenir dans la réalisation de la cytocinèse (Chen and Tang, 2014; Kasahara et al., 2007).

Concernant la famille des Eph:éphrines, la bibliographie indicative d'un rôle potentiel dans la prolifération cellulaire à déjà été discutée plus haut. En revanche, la bibliographie décrivant un rôle de la signalisation Eph:éphrine dans la division cellulaire et la cytocinèse est balbutiante.
Le score de réponses du moteur de recherche bibliographique MEDLINE pour les mots clés « Eph AND mitosis » est de 2 citations. La plus ancienne (1980) ne traite pas de la famille

Eph:éphrine mais de la pré-éclampsie (EPH-gestosis) (Gille, 1980). La seconde citation est une étude réalisée sur des cellules de myocardes humains en culture et sur un modèle de souris. Les auteurs observent, suite à la stimulation de la voie Eph, une augmentation de la division des cellules cardiaques, sans toutefois proposer de mécanistique (Mansson-Broberg et al., 2008).

Si l'on teste les mots clés « Eph AND cytokinesis » le nombre de citation dans MEDLINE se réduit à une citation. Il s'agit d'un rapport en français qui démontre que de la phosphatase PTPL1 est régulée par la stimulation de la voie œstrogène sans lien avec la cytocinèse (Freiss et al., 2004). Il s'agit en fait d'un croisement de mots clés. PTPL1 est une phosphatase capable de déphosphoryler les éphrineBs (Palmer et al., 2002). C'est aussi une protéine enrichie au niveau du midbody durant la cytocinèse et dont la surexpression ou la réduction de son activité kinase induit des défauts d'abscission (Herrmann et al., 2003).

Objectifs de la Thèse

Dans la première partie de l'introduction de ce mémoire, je vous ai décrit la division cellulaire, au travers du cycle cellulaire, de certains mécanismes de sa régulation et des changements morphologiques majeurs pour la cellule, notamment durant la mitose et la cytocinèse. Dans la deuxième partie, je vous ai décrit le fonctionnement d'une famille de protéines impliquée dans la communication cellulaire locale, la famille des Eph-éphrines et ses principaux rôles connus.
Enfin, dans la dernière partie, j'ai mis en évidence les quelques données récentes qui proposent comment un tissu peut tolérer les bouleversements de la division cellulaire tout en préservant son fonctionnement, sa cohésion et son intégrité.

L'objectif de mon projet de recherche était d'étudier le rôle de la signalisation Eph/éphrine, acteur de la communication cellulaire locale, dans la division cellulaire.
Les résultats obtenus au cours de ma thèse pourraient avoir des résonnances pour la compréhension de mécanismes développementaux, comme la neurogénèse embryonnaire, mais également la compréhension de processus pathologiques, comme la tumorigénèse.

Résultats

1. **Manuscrit soumis : “Eph mediated tyrosine phosphorylation of citron kinase controls abscission and promotes neuronal polyploidy”**

Eph-mediated tyrosine phosphorylation of Citron Kinase controls abscission and promotes neuronal polyploidy

Thomas Jungas[1,5], Carine Froment[2,5], Odile Burlet-Schiltz[2,5], Arnaud Besson[3, 4, 5*] and Alice Davy[1, 5, 6*]

[1]Centre de Biologie du Développement, CNRS, 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

[2]CNRS, IPBS (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale), 205 Route de Narbonne, 31077 Toulouse, France

[3]INSERM UMR1037, Cancer Research Center of Toulouse, Toulouse, France

[4]CNRS ERL5294, Toulouse, France

[5]Université de Toulouse, Toulouse, France

Running title : Citron kinase in Eph-induced abscission failure

Keywords : receptor tyrosine kinase, Src, ephrin, cytokinesis, aneuploidy, cell-cell communication, mass spectrometry, neuron, neocortex, neural progenitors

[*]these authors contributed equally to this work

[6] corresponding author: alice.davy@univ-tlse3.fr

ABSTRACT

Cytokinesis is the last step of cell division, culminating in the physical separation of daughter cells at the end of mitosis. Cytokinesis is a tightly regulated process that until recently was mostly viewed as a cell-autonomous event. Here, we investigated the role of Ephrin:Eph signalling, a well-known local cell-to-cell communication pathway, in cell division. We show that activation of Eph signalling in vitro leads to polyploidy and we demonstrate that this is caused by alteration of the penultimate step of cytokinesis, abscission. Control of abscission requires Eph kinase activity and we identified Src kinase and Citron-Kinase (CitK) as downstream effectors in the Eph-induced signal transduction cascade. In addition, we demonstrate that Src kinase directly phosphorylates CitK, we single-out the specific tyrosine residues of CitK that are phosphorylated and show that tyrosine phosphorylation of CitK impairs cytokinesis. Lastly, we provide evidence that CitK is phosphorylated on tyrosines in vivo and we report that similar to CitK, Ephrin:Eph signalling controls neuronal ploidy in the developing neocortex. Our study indicates that CitK integrates intracellular and extrinsic signals provided by the local environment to coordinate cytokinesis completion.

INTRODUCTION

Cytokinesis is the last step of cell division allowing physical separation of the two daughter cells and faithful partitioning of genetic and cytoplasmic material [1]. Tight control of cytokinesis completion is essential since cytokinesis failure has been associated with carcinogenesis [2] but also because incomplete cytokinesis is an evolutionarily conserved physiological event required for development and homeostasis of a number of tissues harboring polyploid cells [3, 4]. Cytokinesis begins with the assembly and constriction of an equatorial contractile ring progressing to the formation of a narrow intercellular bridge (ICB)

between the nascent daughter cells. Physical separation of the two daughter cells ends cytokinesis through an elusive event called abscission. Completion of abscission requires the coordination of several cellular functions such as membrane trafficking, cytoskeletal rearrangements and orderly recruitment of molecular complexes to the midbody [5, 6]. A key player in proper assembly of the midbody is Citron-Kinase (CitK), a protein that itself localizes to the midbody [7-12]. Although CitK was first thought to be important for contraction of the equatorial actomyosin ring via phosphorylation of MLC2, it has more recently emerged that CitK is in fact dispensable for these steps and that its role is primarily to act as a scaffold protein during late cytokinesis and abscission [8-10, 12, 13]. Indeed, CitK loss of function causes abscission defects with frequent reopening of the ICB, causing multinucleation [9, 10, 14]. In mammals, CitK is required for cytokinesis of a limited number of cell types, including neural progenitors of the developing neocortex. Accordingly, loss of CitK impairs cytokinesis of these cells, leading to a sharp increase in the number of binucleated and polyploid neurons [15-17].

In solid organs dividing cells are part of a tissue and recent studies suggest that in addition to intracellular events, successful cytokinesis requires coordination of extracellular processes [18, 19]. For instance, cooperation between dividing cells and their neighbors is necessary to remodel cell adhesion during cytokinesis while maintaining tissue cohesiveness [20-22]. Ephrin:Eph signalling is a local communication pathway that regulates adhesion between neighboring cells [23] and plays an important role in development but also in tumor dissemination and stem cell homeostasis [24]. We demonstrated previously that Ephrin:Eph signalling controls neural progenitors self-renewal [25-27]. Here, we investigated the role of Ephrin:Eph signalling in cell division. We show that activation of EphB2 leads to a defect in abscission which correlates with multinucleation and polyploidy. We identified Src kinase (Src) and CitK as downstream effectors of the pathway. Using Mass Spectrometry (MS), we

isolated the specific tyrosine residues of CitK that are directly phosphorylated by Src and we provide evidence that tyrosine phosphorylation of CitK is detrimental to cytokinesis. Lastly, we provide evidence that CitK is phosphorylated on tyrosines in neural progenitors in vivo and that similar to CitK, Ephrin:Eph signalling controls neuronal ploidy.

RESULTS AND DISCUSSION

Activation of EphB2 forward signalling induces abscission defects

To test whether Ephrin:Eph signalling regulates cell division, we first used U251 cells, a human glioma cell line which expresses a number of Eph receptors endogenously (Sup Figure 1) [28]. Stimulation of Eph forward signalling in U251 cells using bath application of clustered Efnb1-Fc recombinant protein led to a time-dependent increase in the proportion of daughter cells connected by an ICB (Figure 1a, b). Because EphB2 is the member of the family which is most highly expressed in U251 (Sup Figure 1), we next tested whether this receptor was indeed responsible for cytokinesis failure. We transfected EphB2 in HeLa cells that express very little to no detectable levels of Eph receptors (Sup Figure 1) and compared transfected and non-transfected cells. Similar to U251, stimulation of forward signalling led to an increase in the proportion of EphB2+ cells connected by an ICB, while the proportion of EphB2- cells connected by an ICB did not change over time (Figure 1c, d). These results indicate that activation of EphB2 forward signalling leads to cytokinesis failure. Cytokinesis failure often correlates with increased multinucleation or aneuploidy [29], two parameters that were also increased in EphB2+ cells (EphB2) compared to EphB2- cells (NT) following stimulation of forward signalling (Figure 1e and Sup Figure 2a). Alternatively, cytokinesis defects can lead to cell death [30]. Accordingly, stimulation of Eph forward signalling led to a sharp increase in cell death (Sup Figure 2b). To characterize the cause of EphB2-induced cytokinesis failure, we recorded cell division events by time-lapse video microscopy of NT

cells and EphB2^{wt} cells either mock-stimulated or stimulated with Efnb1-Fc to activate forward signalling (Figure 1f-h). Activation of Eph forward signalling did not modify the progression from anaphase to late telophase (Figure 1f), however, the progression from late telophase to disappearance of the ICB was significantly delayed (Figure 1g) compared to control conditions. In extreme cases, daughter cells remained connected throughout the whole recording (Figure 1h, bottom panel). Altogether these results demonstrate that activation of EphB2 forward signalling causes cytokinesis defects ranging from an abscission delay to a complete failure of physical separation.

Ephs are receptor tyrosine kinases which exert many of their biological functions via their kinase activity [23]. To ask whether abscission defects were dependent on the kinase activity of EphB2, we transfected two different kinase-dead mutants of EphB2 (EphB2^{K661R} and EphB2^{3YF}) in HeLa cells and monitored their ability to induce cytokinesis defects (Sup Figure 3a, b). Unlike cells expressing EphB2^{wt}, cells expressing EphB2^{K661R} did not exhibit a cell division defect upon incubation with Efnb1-Fc (Sup Figure 3c). In addition, the progression from late telophase to abscission of daughter cells was not delayed in cells expressing EphB2^{3YF} and the duration of that phase of cytokinesis was comparable to that of control cells (Figure 1f, g). These results demonstrate that abscission defects induced by forward signalling depend on the kinase activity of EphB2.

CitK is a target of EphB2 signalling

To characterize the mechanisms by which EphB2 forward signalling impairs abscission, we monitored endogenous CitK localization in the ICB. CitK is normally restricted to the midbody in late telophase (Figure 2a). Following stimulation of forward signalling, a significant fraction of EphB2+ cells exhibited an abnormal distribution of CitK along the entire length of the ICB (Figure 2a, b). Furthermore, overexpression of CitK in EphB2+ cells

prevented the ICB persistence induced by the activation of forward signalling (Figure 2c) reflecting a functional interaction between EphB2 signalling and CitK during abscission. As mentioned previously, CitK is required to control cytokinesis of neural progenitors in the developing neocortex and loss of CitK leads to an increase in the number of polyploid neurons [15-17]. We thus reasoned that cytokinesis of neural progenitors, which express CitK [17] (Figure 2d) and EphB2 [27], may similarly be controlled by Ephrin:Eph signalling. To test this prediction, we generated mice in which Eph forward signalling is abrogated specifically in neural progenitors (*Efnb1*^{loxlox}; *Efnb2*^{loxlox}; *Nestin-Cre*) and quantified neuronal ploidy. Cytometry analyses indicated that loss of Ephrin:Eph signalling in neural progenitors led to a sharp reduction in the fraction of polyploid neurons present at P0 in the cortex of ephrin mutants compared to age-matched controls (Figure 2e and Sup Figure 4). These results reveal that Ephrin:Eph signaling is required to promote physiological neuronal polyploidy in vivo, and support the in vitro data establishing a functional interaction between Eph signalling and CitK.

As described above, EphB2-induced abscission failure is dependent on the tyrosine kinase activity of EphB2 raising the possibility that CitK might be phosphorylated by EphB2. Indeed, immunoprecipitated CitK from stimulated EphB2+ cells is detected by immunoblotting with an antibody specific to phosphorylated tyrosines (P-Tyr) (Figure 3a). To assess whether CitK is a direct substrate for EphB2, we performed *in vitro* kinase assays with purified recombinant EphB2 kinase and purified CitK. No phosphorylation on tyrosine was detected on CitK by immunoblotting with the P-Tyr antibody, even for the highest amount of CitK tested (Figure 3b). Detection of phosphorylated recombinant EphB2 kinase validated the kinase assay (Figure 3b, bottom). It has been shown previously that Src-family kinases are activated downstream of Eph receptors in some cellular contexts [24]. Accordingly, Src is activated in EphB2+ cells stimulated with Efnb1-Fc, as detected by immunoblotting with an

antibody against activated Src (Src^{Y416}) (Figure 3c). As expected, pre-treatment of EphB2+ cells with the Src inhibitor PP2 prior to activation of Eph forward signalling prevented Src activation (Figure 3c top). Notably, PP2 treatment also abolished tyrosine phosphorylation of CitK (Figure 3c bottom), suggesting that CitK may be phosphorylated by Src. To test this hypothesis, we performed *in vitro* kinase assays with recombinant active Src kinase and purified CitK as a substrate. Immunoblotting with anti-phosphotyrosine antibodies revealed that purified CitK was indeed phosphorylated in presence of recombinant Src kinase (Figure 3d). Altogether these results indicate that EphB2 forward signalling activates Src kinase which in turn phosphorylates CitK on tyrosines. Importantly, in neural progenitors, CitK co-localized with phospho-tyrosines, suggesting that this post-translation modification of CitK is physiological (Figure 3e).

Tyrosine phosphorylation of CitK impairs cytokinesis

CitK is a large multidomain protein which contains a number of putative serine/threonine and tyrosine phosphorylation sites. To identify the specific tyrosine residues of CitK that are phosphorylated by Src, we used *in vitro* kinase assays described above and nanoLC-MS/MS analysis. We identified 9 tyrosines on CitK that are directly phosphorylated in a Src-dependent manner among the 47 tyrosines that are present in the amino acid sequence (Figure 3f, g and Sup Table 1). Phosphorylated tyrosines were distributed along the entire length of the protein, some of them matching to key domains (Figure 3g). To assess the relevance of these modifications for cytokinesis, we first tested the ability of individual domains of CitK to rescue the abscission failure induced by activation of EphB2. Unlike full length CitK (FL), CitK fragments corresponding to the serine/threonine kinase domain (F1) and to the PH+CNH domains (F5) were unable to rescue the persistence of the ICB between daughter cells (Figure 4a). On the other hand, expression of CitK fragments corresponding to

the coiled-coil domain, Rho-binding domain (RBD) and Zinc finger domain (F2, F3 and F4, respectively) rescued the EphB2-induced ICB persistence phenotype (Figure 4a). These data are consistent with previously published results demonstrating that CitK mediates the transition from constriction to abscission via its coiled-coiled domain [10]. Based on these results, we narrowed down the list of phosphorylated tyrosines to be tested functionally. Specifically, we focused on tyrosines 1237 and 1246 located in the RBD of CitK and postulated that phosphorylation on those tyrosine residues (Sup Figure 5) may negatively impact CitK function during abscission. We mutated both tyrosines into either phospho-mimetic (Y to E) or unphosphorylatable (Y to A) residues in the F3 fragment (RBD domain) of CitK (Sup Figure 6) and functionally tested the effect of these mutated F3 fragments on cytokinesis. We observed that the phospho-mimetic $F3^{Y>E}$ fragment was sufficient to cause a marked increase in multinucleation while the WT or unphosphorylatable $F3^{Y>A}$ fragments both had limited effects on multinucleation (Figure 4b). Lastly, we tested whether these mutant F3 fragments were able to rescue the phenotypes induced by EphB2 forward signalling. While both $F3^{wt}$ and $F3^{Y>A}$ fragments prevented EphB2-induced ICB persistence, expression of the $F3^{Y>E}$ fragment did not rescue ICB maintenance induced by EphB2 (Figure 4c). Altogether, these results indicate that phosphorylation of CitK on tyrosines 1237 and 1246 are detrimental to cytokinesis.

Two independent large scale proteomic analyses of adult mouse brain have reported phosphorylation of CitK on tyrosine 1237, demonstrating that this exact modification is physiological [31, 32]. It was reported previously that loss of CitK in the developing brain leads to an increase in the fraction of polyploid neurons [15-17]. We show here that loss of Ephrin:Eph signalling in neural progenitors induces an opposite phenotype – a decrease in the number of polyploid neurons. It is now recognized that in physiological conditions a substantial fraction of neurons of the postnatal mammalian cerebral cortex present DNA content variations

including polyploidy and this feature is invoked as a basis for neuronal diversity [33, 34]. The mechanisms by which these somatic variations in DNA content arise remain elusive and our results suggest that incomplete cytokinesis of neural progenitors contributes to this process. Of note, another receptor tyrosine kinase, $p75^{NGF}$ has recently been implicated in controlling neuronal ploidy, but no mechanistic description was reported [35].

Our results show that activation of EphB2 forward signalling alters completion of abscission. EphB2 activates Src kinase which in turn phosphorylates CitK in the RBD on tyrosines 1237 and 1246. Although it was shown previously that Src and CitK co-localize at the ingressing furrow and midbody during cytokinesis [36] and that Src kinase activity plays a role in cytokinesis [37-39], the direct phosphorylation of CitK by Src was not described. Tyrosine phosphorylation of CitK correlates with its mislocalization from the midbody, abscission delay and cytokinesis failure (persistence of the ICB and polyploidy). Overexpression of wild type CitK is sufficient to compensate for alterations of endogenous CitK function, presumably because a significant fraction of overexpressed CitK remains unphosphorylated. Consistent with this, a phospho-mimetic CitK RBD is unable to rescue EphB2-induced abscission defect. Furthermore, this phospho-mimetic CitK RBD is sufficient to cause cytokinesis defects, preventing abscission and promoting multinucleation, demonstrating that tyrosine phosphorylation of CitK modulates its function in cytokinesis. Both loss and gain of CitK have been reported previously to promote multinucleation [9, 10, 14] indicating that tight control of CitK function is required for the completion of cytokinesis. Tyrosine phosphorylation could be such a regulatory switch, allowing for fine tuning of the progression through abscission. As mentioned above, during cytokinesis CitK plays an important role in controlling the orderly recruitment of key effectors at the midbody, including RhoA, anillin, MKLP1 and KIF14 [9, 10, 12, 40]. Whether tyrosine phosphorylation of CitK RBD disrupts these protein-protein interactions remains to be explored. Alternatively, activation of forward

signalling and phosphorylation of CitK could perturb the function of the molecular machinery required for membrane splitting on each side of the midbody, including components of the endosomal sorting complex required for transport-III (ESCRT-III) [6].

In conclusion, our study uncovers a novel role for Ephrin:Eph signalling in controlling cell division and ploidy; and provides the first functional characterization of phosphorylation events on CitK in cytokinesis. More generally, our findings support the concept that local environment plays an important role in coordinating cell division and suggests that CitK could be an integrator of extrinsic and intrinsic information during cytokinesis.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Forward signalling was activated by adding pre-clustered Efnb1-Fc recombinant protein to the cell culture medium. Live imaging was performed in an Incucyte FLR (Essen Bioscience). All quantifications on images were performed by manual counting. For experiments involving a single pair of conditions, statistical significance between the two sets of data was analysed with a two-tailed, unpaired Student t-test with Prism5 (GraphPad software). For data sets containing more than two samples, One-way ANOVA with a classical Bonferroni multiple comparison post-test was used to determine adjusted P values. Detailed information regarding methodology and any associated references are available in the Supplemental Experimental Procedures.

ACKNOWLEDGEMENTS

The EphB2-GFP, EphB2-3YF-GFP, HA-EphB2^{wt} and HA-EphB2^{K661R} constructs were generous gifts from Dr. Tony Pawson (Samuel Lunenfeld Institute, Toronto). The CitK cDNA was kindly provided by Dr. Ferdinando DiCunto (University of Turin). FACS analysis and images were generated in the Toulouse Rio Imaging facility with the help of Brice Ronsin for

imaging. We thank Maxime Bertrand for technical help and our laboratory colleagues for critical reading of the manuscript. This work was supported by core funding from the CNRS, a grant from Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (SFI20101201607) and in part by the French Ministry of Research with the Investissement d'Avenir Infrastructures Nationales en Biologie et Santé program (ProFI, Proteomics French Infrastructure project, ANR-10-INBS-08). AB is supported by grants from the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer, Ligue Nationale Contre le Cancer and Institut National du Cancer. All authors are CNRS researchers.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

TJ designed, carried out and analyzed experiments. CF and OS performed and analyzed MS experiments. AD wrote the manuscript. AB and AD supervised the project.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

REFERENCES

1. Green, R.A., Paluch, E. & Oegema, K. Cytokinesis in animal cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **28**, 29-58 (2012).
2. Sagona, A.P. & Stenmark, H. Cytokinesis and cancer. *FEBS Lett.* **584**, 2652-2661 (2010).
3. Haglund, K., Nezis, I.P. & Stenmark, H. Structure and functions of stable intercellular bridges formed by incomplete cytokinesis during development. *Commun Integr Biol.* **4**, 1-9 (2011).
4. Davoli, T. & de Lange, T. The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**, 585-610 (2011).
5. Agromayor, M. & Martin-Serrano, J. Knowing when to cut and run: mechanisms that control cytokinetic abscission. *Trends Cell Biol.* **23**, 433-441 (2013).
6. Mierzwa, B. & Gerlich, D.W. Cytokinetic Abscission: Molecular Mechanisms and Temporal Control. *Dev Cell* **31**, 525-538 (2014).
7. Bassi, Z.I. *et al.* Sticky/Citron kinase maintains proper RhoA localization at the cleavage site during cytokinesis. *J Cell Biol.* **195**, 595-603 (2011).
8. Naim, V., Imarisio, S., Di Cunto, F., Gatti, M. & Bonaccorsi, S. Drosophila citron kinase is required for the final steps of cytokinesis. *Mol Biol Cell* **15**, 5053-5063 (2004).
9. Gai, M. *et al.* Citron kinase controls abscission through RhoA and anillin. *Mol Biol Cell* **22**, 3768-3778 (2011).
10. Watanabe, S., De Zan, T., Ishizaki, T. & Narumiya, S. Citron kinase mediates transition from constriction to abscission through its coiled-coil domain. *J Cell Sci.* **126**, 1773-1784 (2013).

11. Madaule, P. *et al.* Role of citron kinase as a target of the small GTPase Rho in cytokinesis. *Nature* **394**, 491-494 (1998).
12. Bassi, Z.I., Audusseau, M., Riparbelli, M.G., Callaini, G. & D'Avino, P.P. Citron kinase controls a molecular network required for midbody formation in cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 9782-9787 (2013).
13. Serres, M.P. *et al.* p27(Kip1) controls cytokinesis via the regulation of citron kinase activation. *J Clin Invest.* **122**, 844-858 (2012).
14. Echard, A., Hickson, G.R., Foley, E. & O'Farrell, P.H. Terminal cytokinesis events uncovered after an RNAi screen. *Curr Biol* **14**, 1685-1693 (2004).
15. Di Cunto, F. *et al.* Defective neurogenesis in citron kinase knockout mice by altered cytokinesis and massive apoptosis. *Neuron* **28**, 115-127 (2000).
16. Sarkisian, M.R., Li, W., Di Cunto, F., D'Mello, S.R. & LoTurco, J.J. Citron-kinase, a protein essential to cytokinesis in neuronal progenitors, is deleted in the flathead mutant rat. *J Neurosci* **22**, RC217 (2002).
17. LoTurco, J.J., Sarkisian, M.R., Cosker, L. & Bai, J. Citron kinase is a regulator of mitosis and neurogenic cytokinesis in the neocortical ventricular zone. *Cereb Cortex* **13**, 588-591 (2003).
18. Le Bras, S. & Le Borgne, R. Epithelial cell division - multiplying without losing touch. *J Cell Sci.* **127**, 5127-5137 (2014).
19. Herszterg, S., Pinheiro, D. & Bellaïche, Y. A multicellular view of cytokinesis in epithelial tissue. *Trends Cell Biol.* **24**, 285-293 (2014).
20. Herszterg, S., Leibfried, A., Bosveld, F., Martin, C. & Bellaiche, Y. Interplay between the dividing cell and its neighbors regulates adherens junction formation during cytokinesis in epithelial tissue. *Dev Cell.* **11**, 256-270 (2013).
21. Founounou, N., Loyer, N. & Le Borgne, R. Septins regulate the contractility of the actomyosin ring to enable adherens junction remodeling during cytokinesis of epithelial cells. *Dev Cell.* **24**, 242-255 (2013).
22. Guillot, C. & Lecuit, T. Adhesion disengagement uncouples intrinsic and extrinsic forces to drive cytokinesis in epithelial tissues. *Dev Cell* **24**, 227-241 (2013).
23. Lisabeth, E.M., Falivelli, G. & Pasquale, E.B. Eph Receptor Signaling and Ephrins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **5**, a009159 (2013).
24. Gucciardo, E., Sugiyama, N. & Lehti, K. Eph- and ephrin-dependent mechanisms in tumor and stem cell dynamics. *Cell Mol Life Sci.* **71**, 3685-3710 (2014).
25. Qiu, R. *et al.* Regulation of neural progenitor cell state by ephrin-B. *J. Cell Biol.* **181**, 973-983 (2008).
26. Arvanitis, D.N., Jungas, T., Behar, A. & Davy, A. Ephrin-B1 reverse signaling controls a post-transcriptional feedback mechanism in neural progenitors. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 2508-2517 (2010).
27. Arvanitis, D.N. *et al.* Ephrin-B1 maintains apical adhesion of neural progenitors. *Development* **140**, 2082-2092 (2013).
28. Nakada, M. *et al.* The phosphorylation of EphB2 receptor regulates migration and invasion of human glioma cells. *Cancer Res.* **64**, 3179-3185 (2004).
29. Lacroix, B. & Maddox, A.S. Cytokinesis, ploidy and aneuploidy. *J Pathol.* **226**, 338-351 (2012).
30. Joshi, S., Braithwaite, A.W., Robinson, P.J. & Chircop, M. Dynamin inhibitors induce caspase-mediated apoptosis following cytokinesis failure in human cancer cells and this is blocked by Bcl-2 overexpression. *Mol Cancer* **10**, 78 (2011).
31. Ballif, B.A., Carey, G.R., Sunyaev, S.R. & Gygi, S.P. Large-scale identification and evolution indexing of tyrosine phosphorylation sites from murine brain. *J Proteome Res* **7**, 311-318 (2008).
32. Wisniewski, J.R., Nagaraj, N., Zougman, A., Gnad, F. & Mann, M. Brain phosphoproteome obtained by a FASP-based method reveals plasma membrane protein topology. *J Proteome Res* **9**, 3280-3289 (2010).

33. Muotri, A.R. & Gage, F.H. Generation of neuronal variability and complexity. *Nature* **441**, 1087-1093 (2006).
34. Bushman, D.M. & Chun, J. The genomically mosaic brain: aneuploidy and more in neural diversity and disease. *Semin Cell Dev Biol* **24**, 357-369 (2013).
35. Lopez-Sanchez, N. & Frade, J.M. Genetic evidence for p75NTR-dependent tetraploidy in cortical projection neurons from adult mice. *J Neurosci* **33**, 7488-7500 (2013).
36. Shafikhani, S.H., Mostov, K. & Engel, J. Focal adhesion components are essential for mammalian cell cytokinesis. *Cell Cycle* **7**, 2868-2876 (2008).
37. Ng, M.M., Chang, F. & Burgess, D.R. Movement of membrane domains and requirement of membrane signaling molecules for cytokinesis. *Dev Cell.* **9**, 781-790 (2005).
38. Kasahara, K. *et al.* Src signaling regulates completion of abscission in cytokinesis through ERK/MAPK activation at the midbody. *J Biol Chem.* **282**, 5327-5339 (2007).
39. Soeda, S. *et al.* v-Src causes delocalization of Mklp1, Aurora B, and INCENP from the spindle midzone during cytokinesis failure. *Exp Cell Res.* **319**, 1382-1397 (2013).
40. Gruneberg, U. *et al.* KIF14 and citron kinase act together to promote efficient cytokinesis. *J Cell Biol* **172**, 363-372 (2006).

FIGURE LEGENDS

Figure 1. EphB2 forward signalling induces abscission failure.

a. U251 cells were stimulated with Efnb1-Fc for 24 h and processed for DNA staining (gray, DAPI), actin staining (red, phalloidin) and immunostaining to detect tubulin (blue). Merged image is on the right bottom panel. Arrowheads indicate an intercellular bridge (ICB) between daughter cells. b. Quantification of the proportion of nascent daughter cells connected by an ICB following Efnb1-Fc stimulation for the indicated time. c. HeLa cells transiently transfected with EphB2 and stimulated with Efnb1-Fc for 24 h were processed for DNA staining (gray, DAPI) and immunostained to detect EphB2 (red) and tubulin (blue). Merged image is on the right bottom panel. Arrowhead indicates an ICB between EphB2+ daughter cells. d. Quantification of the proportion of EphB2- (white bars) and EphB2+ (black bars) cells connected by an ICB at 6, 24 and 48 h post stimulation. e. Untransfected (NT, white bars) and EphB2 transfected (EphB2, black bars) HeLa cells were stimulated with Efnb1-Fc for 24 h and processed for nuclear staining and immunostained to detect tubulin. Proportion of multinucleated cells was recorded manually. f-h. HeLa cells were left untransfected (NT) or were transfected with EphB2^{wt}-GFP (EphB2^{wt}) or EphB2^{3YF}-GFP (EphB2^{3YF}) for 48 h, synchronized and cell division was recorded with an Incucyte microscope, in conditions of mock treatment (IgG-Fc) or Efnb1-Fc treatment. f. Duration of the progression from anaphase to telophase in IgG-Fc or Efnb1-Fc treated cells. g. Duration of the progression from telophase to disappearance of the ICB in IgG-Fc or Efnb1-Fc treated cells. h. Still images from Incucyte recordings of dividing cells (asterisks) in control conditions (top) and EphB2^{wt} cells experiencing forward signalling (bottom). Epifluorescence overlay shows EphB2^{wt} cells (green). Scale bars: 10 µm.

Figure 2. Citron kinase is a target of EphB2 signalling in abscission.

a. HeLa cells untransfected (NT) or transfected with EphB2 (EphB2) and stimulated with Efnb1-Fc were processed for nuclei staining (purple, DAPI) and immunostained to detect tubulin (gray, tubulin), EphB2 (blue, EphB2) and endogenous CitK (green, CitK), as indicated. Lower panels: Quantitative image analyses of CitK distribution in the ICB in untransfected HeLa cells (NT) and EphB2+ (EphB2) cells. Each graph is an overlay of the quantified pixel distribution for CitK along the ICB in 10 representative cells in each condition. b. Proportion of cells in telophase with abnormal distribution of CitK in the ICB. c. HeLa cells were transiently transfected either with CitK, EphB2 or EphB2+CitK and stimulated with Efnb1-Fc for 24 h. The proportion of daughter cells connected by an ICB was quantified in each condition. d. Paraffin sections of wild type E13.5 embryos at the level of the neocortex were processed for nuclei staining (cyan, Draq5) and immunostained to detect CitK (red, CitK). e. Neuronal ploidy was quantified by Flow Analysis Cell Sorting in cortical neurons from control (ctl, *Efnb1*$^{lox\mathrm{lox}}$; *Efnb2*^{loxlox}) and double mutant (dcKO, *Efnb1*$^{lox\mathrm{lox}}$; *Efnb2*^{loxlox}*; Nestin-Cre*) P0 pups. Scale bars: 10 µm.

Figure 3. CitK is tyrosine phosphorylated by Src in response to EphB2 signalling.

a. HEK 293 cells were co-transfected with myc-tagged CitK and EphB2 and stimulated with Efnb1-Fc for 20 min. Protein lysates (top, Input) were immunoblotted with antibodies to detect Myc, P-Tyr and EphB2. Tubulin was used as a loading control. CitK was immunoprecipitated (bottom, Ip) with an anti-Myc antibody and immunoblotted with Myc and P-Tyr antibodies. b. Increasing amounts of purified His-Myc-tagged CitK produced in HEK 293 cells were incubated with recombinant EphB2 kinase in presence of ATP. Negative controls (2 lanes on the right) are samples without EphB2 recombinant kinase. Samples were analyzed by immunoblotting with antibodies to detect Myc and phospho-tyrosines (top). No

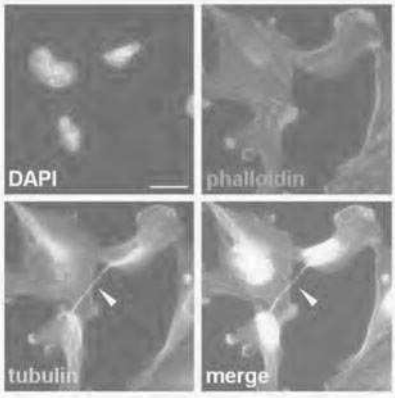
tyrosine phosphorylation on CitK was detected. Auto-phosphorylation of recombinant EphB2 kinase (bottom) indicates that the kinase was active. c. HEK 293 cells were co-transfected with HA-tagged EphB2 and Myc-tagged CitK as indicated and either mock treated or pre-treated with PP2 prior to stimulation with Efnb1-Fc for 20 min. Protein lysates (Input, top) were immunoblotted with antibodies to detect Myc, HA, activated Src (Src^{Y416}) and Src, as indicated. Tubulin was used as a loading control. CitK was immunoprecipitated using anti-Myc antibody and immunoblotted using P-Tyr and anti-Myc antibodies (Ip, bottom). d. Increasing amounts of purified His-Myc-tagged CitK produced in HEK 293 cells were incubated with recombinant Src kinase in presence of ATP. The negative control (right lane) is a sample without recombinant Src. Samples were analyzed by immunoblotting with Myc, Src and P-Tyr antibodies. Purified CitK is phosphorylated on tyrosines in presence of recombinant Src kinase. Bottom panels show that recombinant Src kinase is auto-phosphorylated. e. Paraffin sections of wild type E13.5 embryos at the level of the neocortex were processed for nuclei staining (blue, Draq5) and immunostained to detect CitK (red, CitK) and phosphorylated tyrosines (green, P-Tyr). CitK and P-Tyr signals co-localize (arrowheads). f. Tyrosine phosphorylated peptides identified on CitK by nanoLC-MS/MS. g. Schematic drawing illustrating the distribution of tyrosine residues (top) with respect to CitK protein domains (bottom). Src-phosphorylated tyrosines identified by nanoLC-MS/MS analysis are shown in red (bottom).

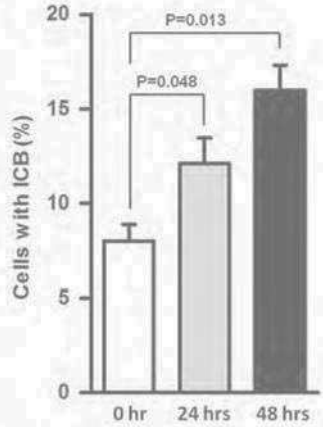
Figure 4. Tyrosine phosphorylation of CitK is detrimental to abscission.

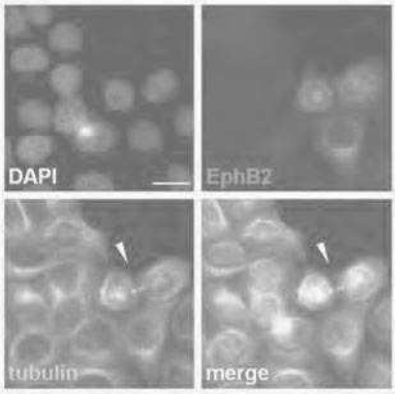
a. Schematic drawing illustrating the distinct domains of CitK that were tested functionally (top). HeLa cells were co-transfected with EphB2 alone or with full length CitK (FL) or the indicated CitK fragments (F1 to F5). Cells were stimulated with Efnb1-Fc and the proportion of cells connected by an ICB at 24 h of treatment was quantified in each condition. Statistical

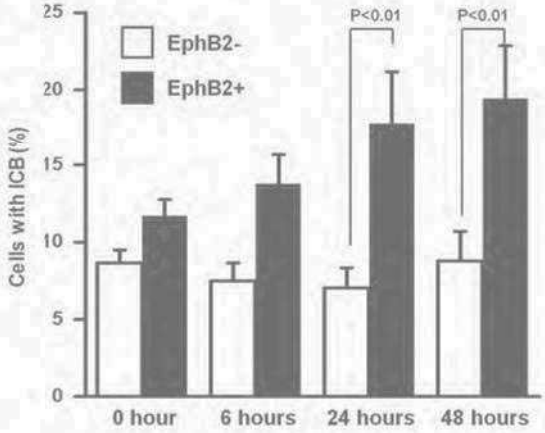
significance was calculated by comparison to the EphB2 condition. b. HeLa cells were untransfected (NT) or transfected with either Myc-tagged CitK-F3^{wt} (F3^{wt}), phospho-mimetic CitK-F3$^{Y>E}$ (F3$^{Y>E}$) or unphosphorylatable CitK-F3$^{Y>A}$ (F3$^{Y>A}$) fragments. The proportion of multinucleated cells was quantified in each condition. c. HeLa cells were untransfected (NT) or co-transfected with EphB2 alone or with Myc-tagged CitK-F3^{wt}, phospho-mimetic CitK-F3$^{Y>E}$ or unphosphorylatable CitK-F3$^{Y>A}$ fragments. Cells were stimulated with Efnb1-Fc for 24 h and the proportion of cells connected by an ICB was quantified in each condition. ns: non significant.

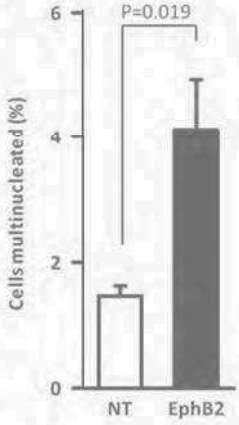
Figure 1- Jungas

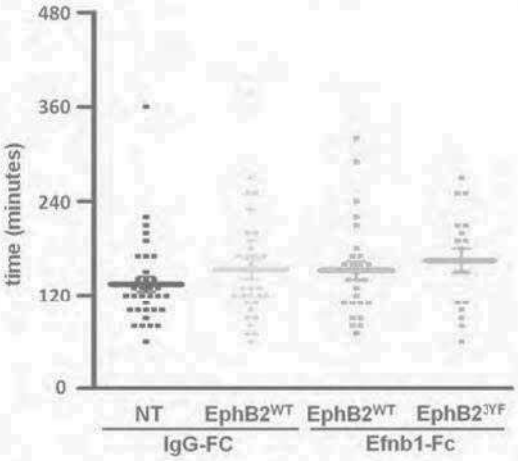


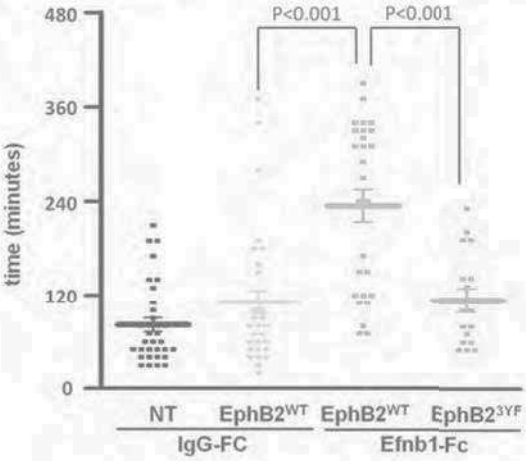












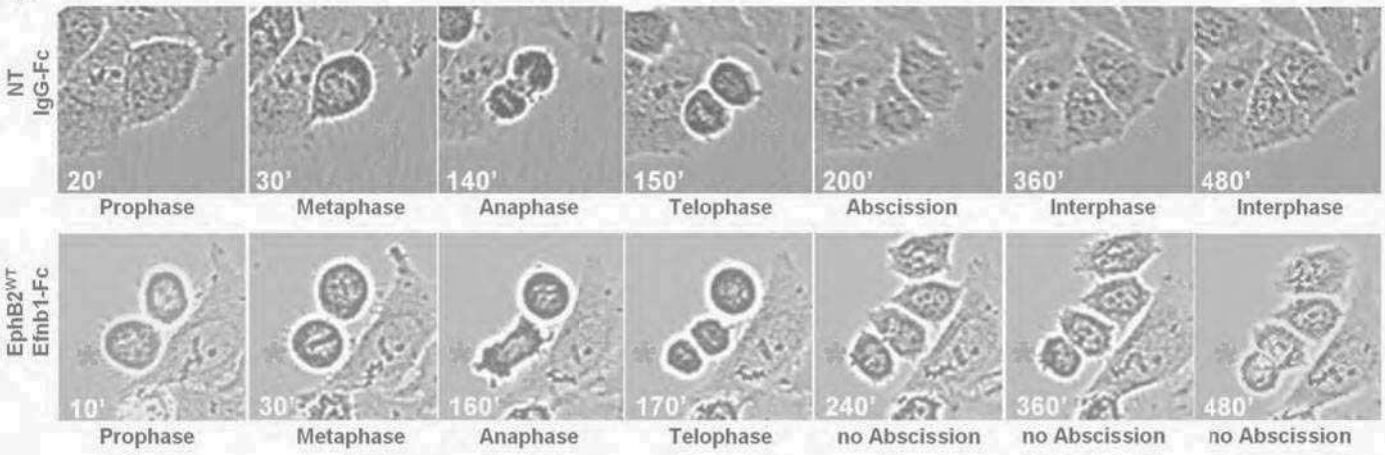


Figure 2- Jungas

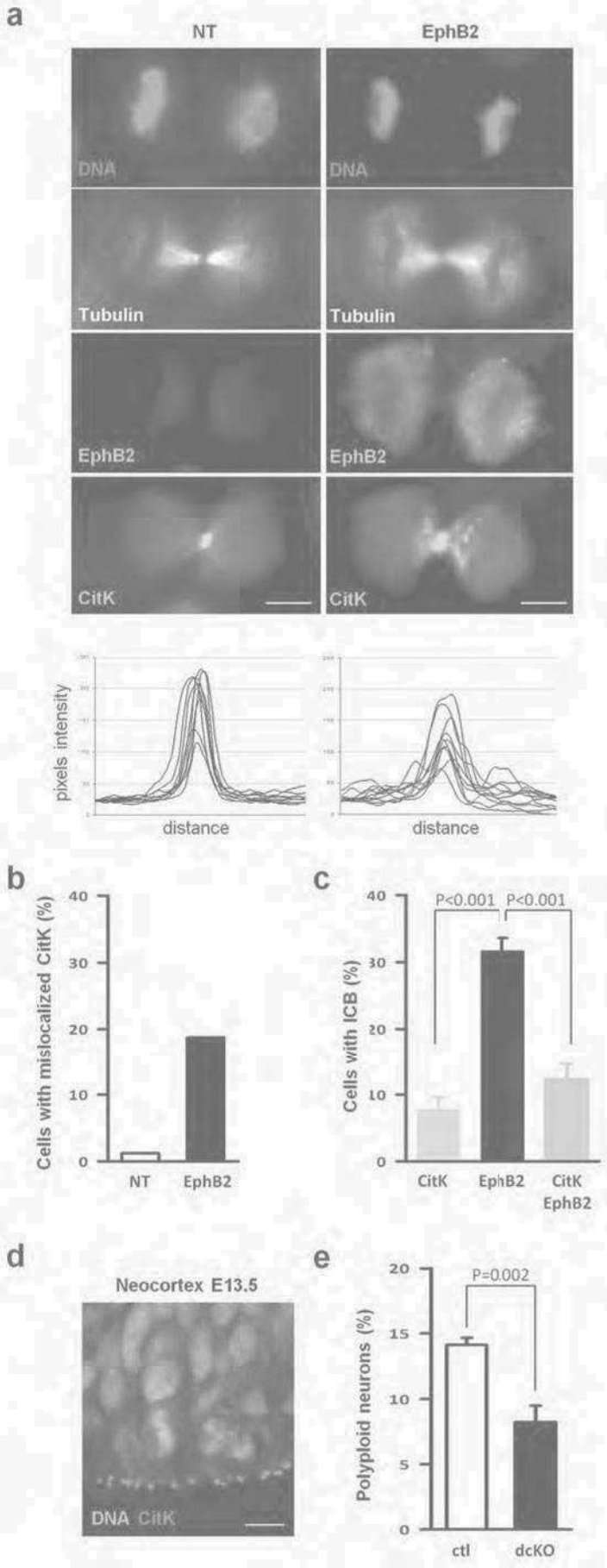
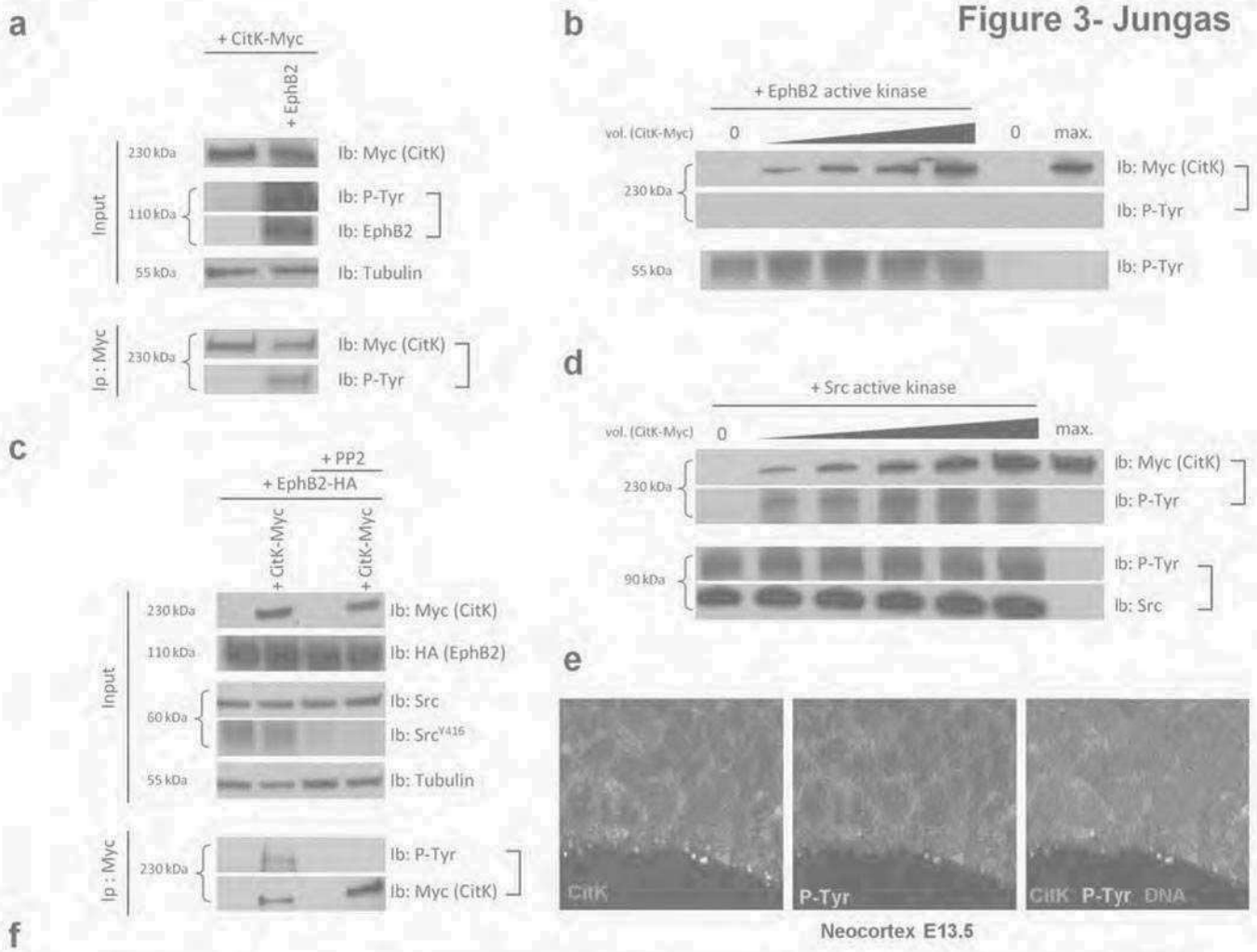


Figure 3- Jungas



f

Phosphosite position	Phosphopeptide sequence	MH+ [Da]	# Missed cleavages	phosphoRS binomial score	phosphoRS site probability (%)
Y262	LPIGTPDpYMoxAPEVLTVMoxNEDR	2473.1054	0	76	96.2
Y1237	SDLEYQLENIQVLpYSHEK	2288.0447	0	119	98.1
Y1237; Y1246	SDLEpYQLENIQVLpYSHEK	2368.0169	0	85	99.7; 95.4
Y1549	ADVPpYILK	998.4961	0	95	100
Y1793	FpYEIDMoxK	1041.3999	0	83	100
Y1800	QpYTLDEFLDK	1351.5822	0	71	88
Y1906	ApYLEIPNPR	1152.5456	0	88	100
Y1925	YLGPAISSGAIpYLASSYQDK	2184.0274	0	125	77.6
Y1970	GPPTpYNEHITK	1336.5939	0	152	92.4
	GPPTpYNEHITKR	1492.6936	1	297	100

g

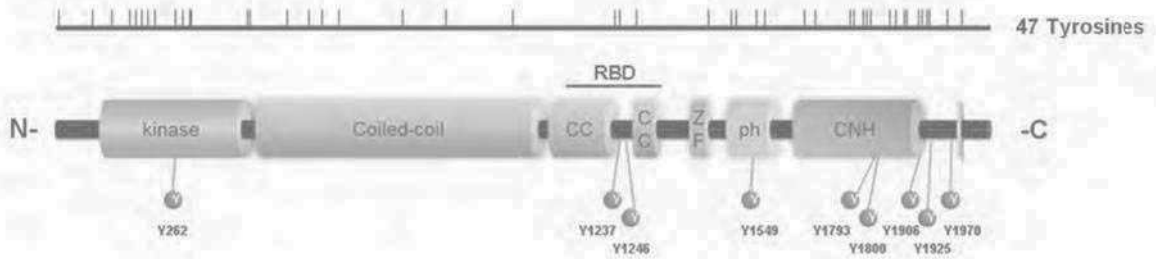
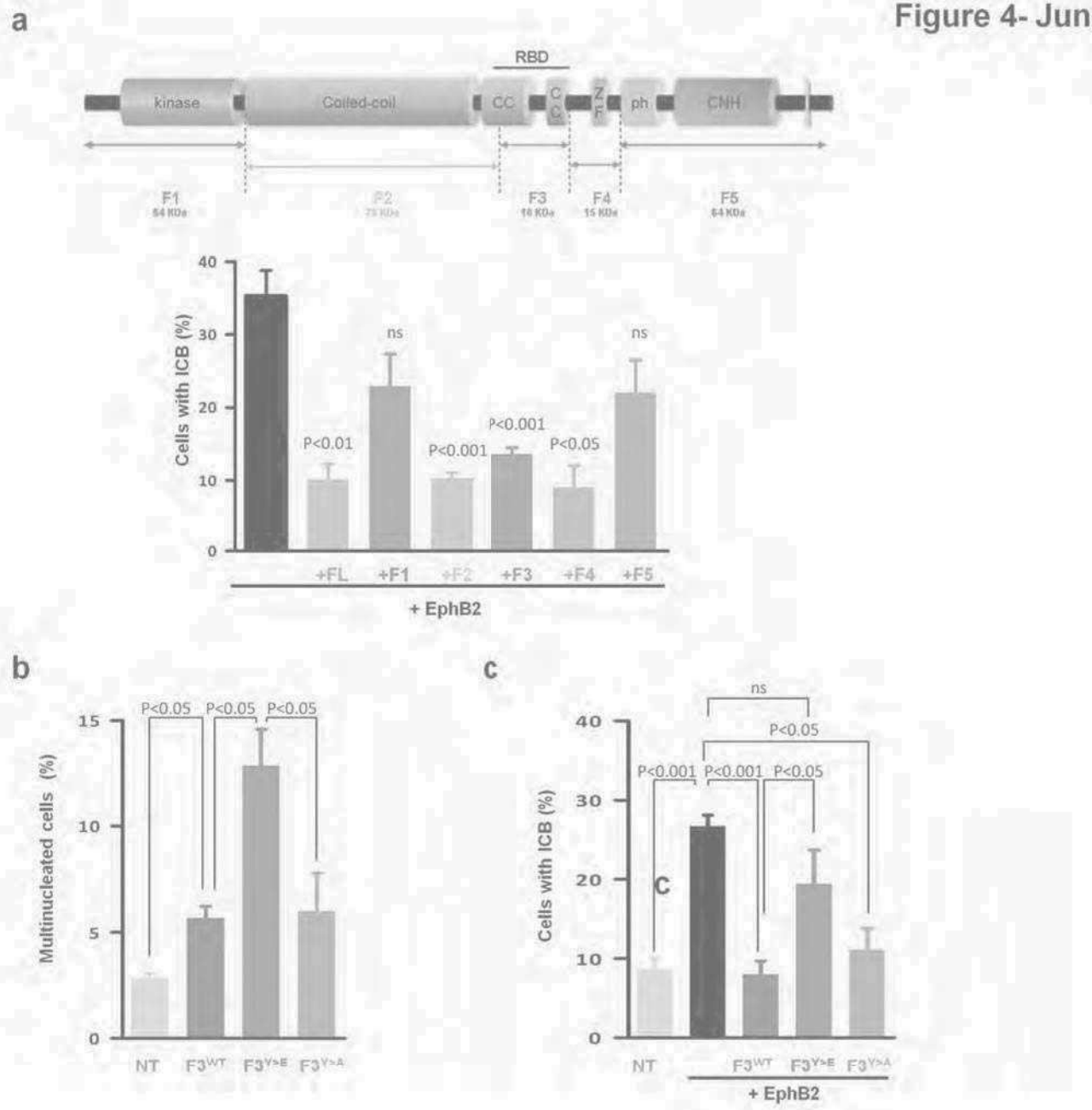
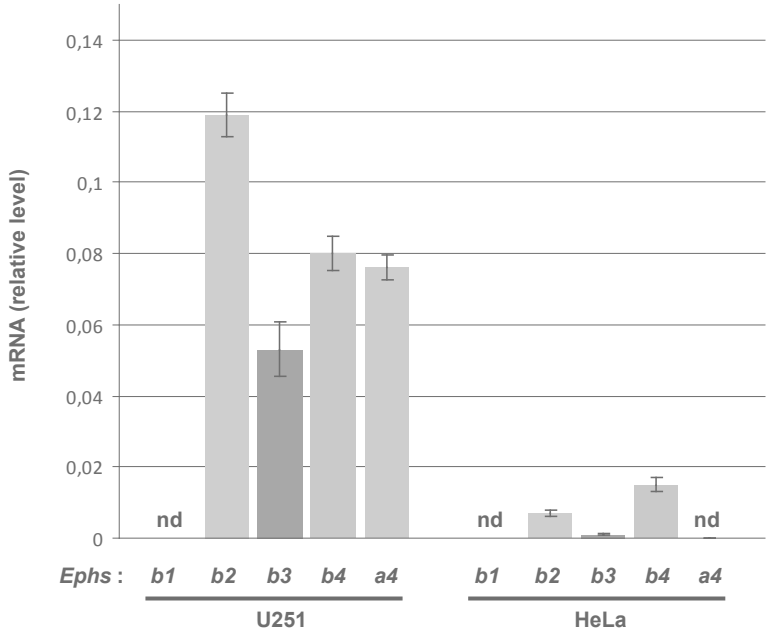


Figure 4- Jungas

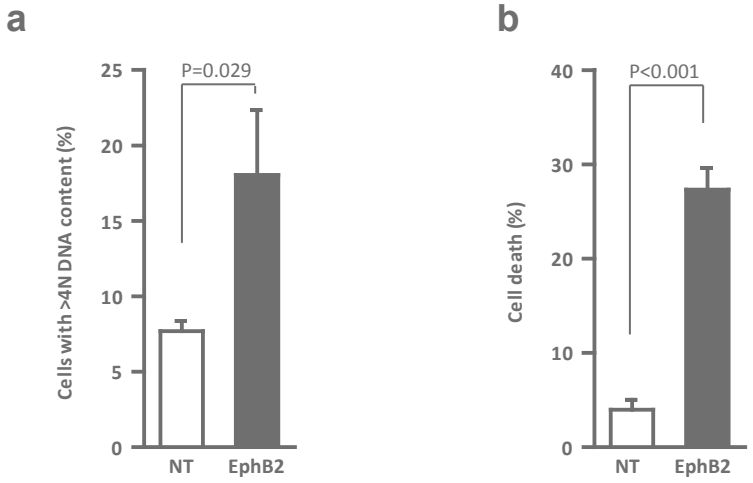


Sup. Figure 1- Jungas



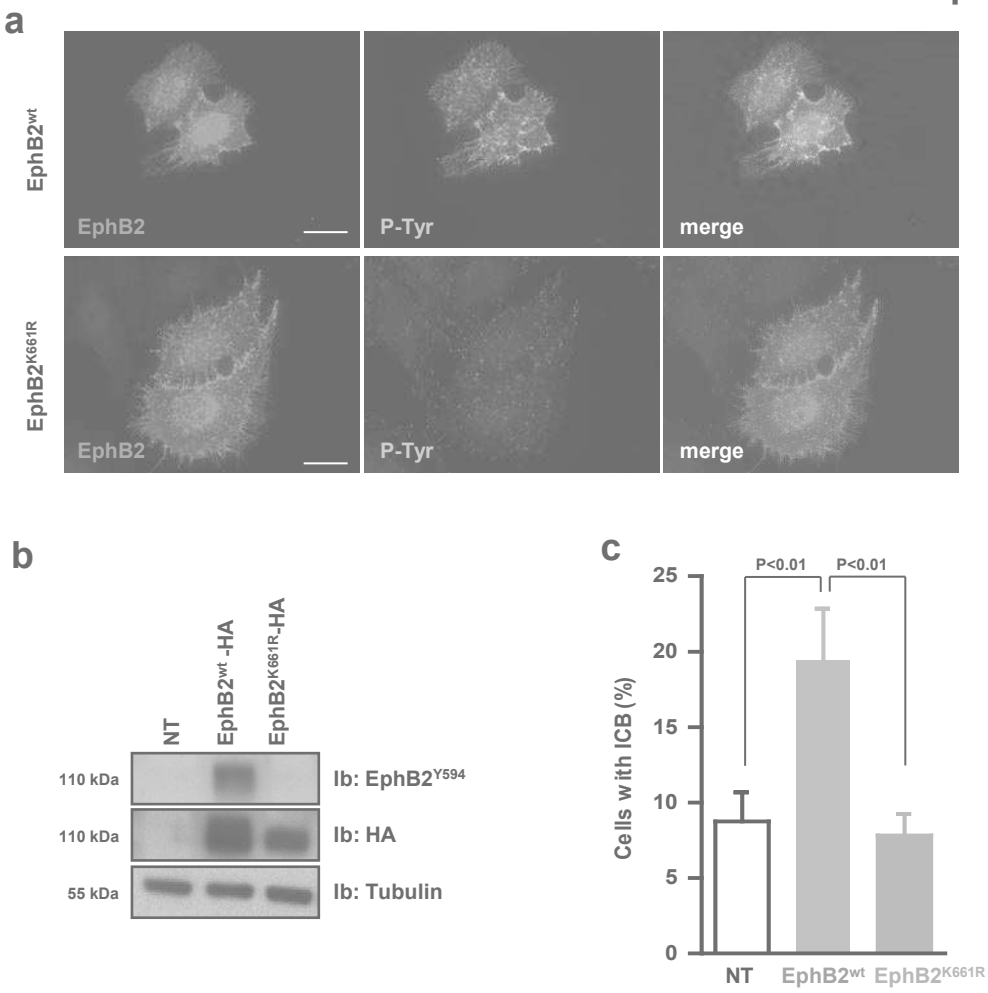
Sup. Figure 1. Expression of Eph receptors in U251 and Hela cells.
Total RNA extracted from U251 and HeLa cells was used for qRT-PCR as described in the methods section. *EphB1, EphB2, EphB3, EphB4 and EphA4 mRNA relative levels were compared to a standard (S16 ribosomal gene). nd: not detected.*

Sup. Figure 2- Jungas



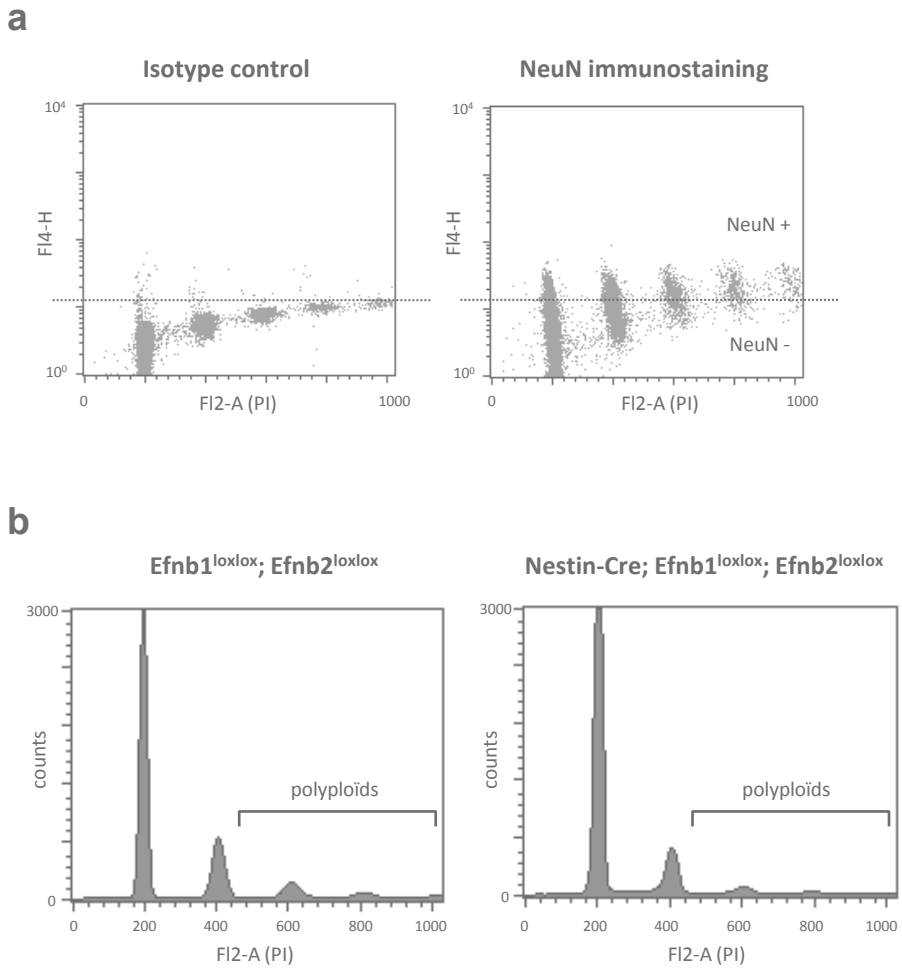
Sup. Figure 2. Activation of forward signaling induces aneuploidy and cell death.
a, b. Untransfected (NT) and EphB2 transfected (EphB2) HeLa cells were stimulated with Efnb1-Fc for 24h and DNA content was stained using propidium iodide. DNA content of EphB2- (white bars) and EphB2+ (black bars) cells was analyzed by flow cytometry to quantify the proportion of aneuploid cells (a) and dying cells (b).

Sup Figure 3- Jungas



Sup. Figure 3. Abscission failure depends on EphB2 kinase activity.
a. HeLa cells were transiently transfected with either wild type EphB2 (EphB2wt, upper panel) or a kinase-dead version of EphB2 (EphB2K661R, lower panels). Cells were stimulated with Efnb1-Fc for 20 min and immunostained to detect EphB2 (red) and phosphorylated tyrosines (green, P-Tyr). Left panels are merged images. b. HeLa cells either untransfected (NT) or transfected with HA-tagged EphB2wt or with a HA-tagged EphB2K661R were stimulated with Efnb1-Fc for 20 min. Protein lysates were analyzed by immunoblotting using an antibody specific to phospho-EphB2 (EphB2Y594) or an antibody to HA. Tubulin was used as a loading control. c. HeLa cells either untransfected (NT) or transfected with EphB2wt or EphB2K661R were treated with Efnb1-Fc. The proportion of cells connected by an ICB after 24 h of treatment was quantified in each condition. Scale bars: 10 µm

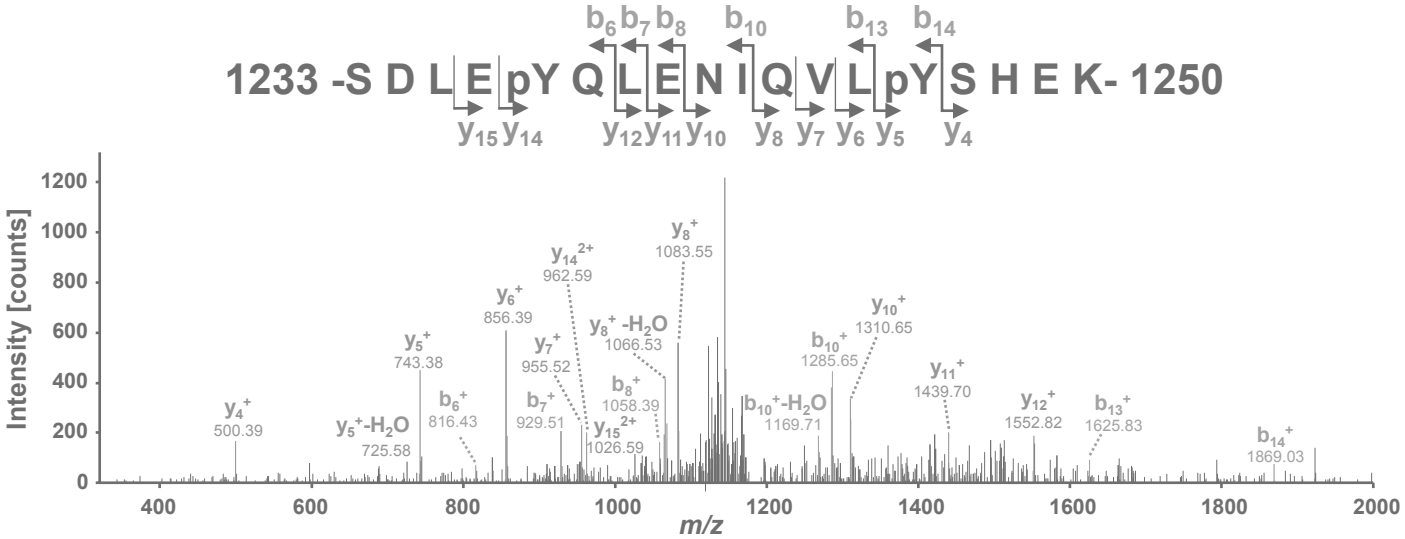
Sup. Figure 4- Jungas



Sup Figure 4 : FACS analyses of P0 neurons.

a. Dot plots used to discriminate between NeuN positive and NeuN negative cells. Left panel, cells incubated with secondary antibody only. Right panel, cells immunostained with NeuN and secondary antibody. Cells above the dashed line were considered as NeuN positive and analysed for DNA content. b. Representative histograms of DNA content analysis of NeuN positive cells in a control (*Efnb1^{loxlox}; Efnb2^{loxlox}*) and a compound mutant (Nestin-Cre; *Efnb1^{loxlox}; Efnb2^{loxlox}*) embryo. Brackets show cells that were considered polyploid with a DNA content of more than two fold compared to cells in G1/G0 (first peak on the left).

Sup. Figure 5- Jungas



Sup Figure 5. MS/MS analysis demonstrates phosphorylation of 1237 and 1246 tyrosine residues. The CID MS/MS spectrum of the diphosphorylated peptide, 1233- SDLEpYQLENIQVLpYSHEK -1250 (doubly charged precursor ion, MH2+, at m/z 2
1184.5121) displays series of y- and b-ions indicating that Y1237 and Y1246 are phosphorylated. pY : phosphorylated tyrosine residues.

Sup. Figure 6- Jungas

a

CitK_F3_Phospho-mimetic (Tyr>glu) (Y>E)

gggcccGGTACCCTGGAGAAGAAGCACGCCATGCTGGAGATGAACGCCCGGAGCTTACAGCAGAAACTAGAGACAGAGCG
KPNI
GGAGCTCAAACAGAGGCTTCTGGAGGAGCAAGCCAAATTGCAGCAGCAGATGGACCTGCAGAAGAACCACATCTTCAGA

CTGACGCAAGGGCTGCAGGAGGCGCTGGACCGGGCGGATCTGCTGAAGACAGAAAGGAGCGACCTGGAG***GAA***CAGCTG

GAAAACATTCAGGTTCTC***GAA***TCTCACGAGAAAGTGAAAATGGAAGGCACAATCTCTCAGCAAACCAAACTCATTGATTTC

CTGCAAGCCAAAATGGACCAGCCTGCTAAAAAGAAAAAGGTTCCTCTGCAGTACAATGAGCTGAAGCTAGCCCTGGAAAA

GGAGAAAGCCCGATGCGCGGAGCTGGAGGAGGCCCTTCAGAAGACCCGCATCGAACTCCGCTCTGCGCGGGAGGAAGCT

GCCCACCGCAAAGCCACGGACCACCCGCACCCGTGACTCGAGcccggg
XHOI

CitK_F3_unphoshorylatable (Tyr>Ala) (Y>A)

gggcccGGTACCCTGGAGAAGAAGCACGCCATGCTGGAGATGAACGCCCGGAGCTTACAGCAGAAACTAGAGACAGAGCG
KPNI
GGAGCTCAAACAGAGGCTTCTGGAGGAGCAAGCCAAATTGCAGCAGCAGATGGACCTGCAGAAGAACCACATCTTCAGA

CTGACGCAAGGGCTGCAGGAGGCGCTGGACCGGGCGGATCTGCTGAAGACAGAAAGGAGCGACCTGGAG***GCA***CAGCTG

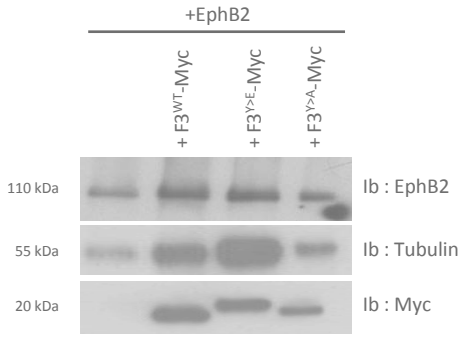
GAAAACATTCAGGTTCTC***GCA***TCTCACGAGAAAGTGAAAATGGAAGGCACAATCTCTCAGCAAACCAAACTCATTGATTTC

CTGCAAGCCAAAATGGACCAGCCTGCTAAAAAGAAAAAGGTTCCTCTGCAGTACAATGAGCTGAAGCTAGCCCTGGAAAA

GGAGAAAGCCCGATGCGCGGAGCTGGAGGAGGCCCTTCAGAAGACCCGCATCGAACTCCGCTCTGCGCGGGAGGAAGCT

GCCCACCGCAAAGCCACGGACCACCCGCACCCGTGACTCGAGcccggg
XHOI

b



Sup. Figure 6. Generation of phosphotyrosine mutants of CitK RBD.
a. Nucleotide sequence of g-Blocks used to introduce phospho-mimetic and phospho-dead mutations in the CitK F3 fragment. Codons coding for tyrosines 1237 and 1246 were replaced with codons coding for glutamate to mimic constitutive phosphorylation. Codons coding for tyrosines 1237 and 1246 were replaced with codons coding for alanine to prevent phosphorylation. b. EphB2 and Myc-tagged CitK F3wt, F3Y>E or F3Y>A were co-transfected into Hek cells and their respective level of expression was monitored by western-blot using the Myc, tubulin and EphB2 antibodies.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plasmids.

Plasmids coding for EphB2 (pcDNA3.1-HA-EphB2 coding for WT mouse EphB2 and pcDNA3.1-HA-K661R coding for kinase-dead mouse EphB2) were obtained from Dr. Pawson. Plasmids coding for Citron kinase (pcDNA3.1-Myc-CRIK_FL, CRIK_F1, CRIK_F2, CRIK_F3, CRIK_F4, CRIK_F5 and pcDNA6-Myc-His-CRIK_FL were described previously [1].

Mutagenesis to produce F3 phosphomimetic ($F3^{Y>E}$) and phospho-dead ($F3^{Y>A}$) citron kinase coding plasmids was performed using the gBlocks technology (idtDNA) and the pcDNA3.1-Myc-CRIK_F3 plasmid as template. gBlocks were synthesized with the coding sequence for oriented cloning with KPNI and XHOI restriction enzymes flanking the CRIK_F3 coding sequence, modified for the 1237 and 1246 residues as shown in Sup Figure 4. CRIK_F3 coding sequence was excised from the pcDNA3.1-Myc-CRIK_F3 plasmid using the mentioned restriction enzymes and replaced by the gBlocks fragments using Rapid DNA ligation Kit (11635379-001, ROCHE). Clones were validated by sequencing before plasmid amplification.

Antibodies.

Anti-tubulin (rabbit, #2148, IF 1:50), anti-phospho Tyrosine (mouse, 4G10, #9411, IF 1:200, WB 1:2000), anti-Src (rabbit, #2108, WB 1:1000), anti-phospho Src Tyr416 (rabbit, #2108, WB 1:1000) were from Cell Signalling. Phalloidin (ab176753, IF 1:200) and anti-phospho EphB2 Tyr594 (rabbit, ab61791, IF 1:200, WB 1:1000) were from Abcam. Anti-Citron kinase (goat, sc-1848, IF 1:200, WB 1:1000) and anti-cMyc (mouse, 9E10, sc-40, IF 1:100, WB 1:1000, Co-IP 1:200) were from Santa Cruz Biotechnology. Anti-HA (mouse, 16B12, IF 1:500, WB 1:2000) is from Covance. Anti-EphB2 (goat, AF467, IF 1:50, WB 1:500) is from R & D systems. Anti-tubulin (mouse, clone AA4.3, IF 1:50) is from Hybridoma Banks. Anti-tubulin (mouse, DM1.a, WB 1:1000) is from Sigma. Anti-NeuN (mouse, MAB377, cytometry 1/100) is from Millipore. Secondary antibodies coupled to Alexa or Cyanine (IF 1:250) or coupled to HRP (WB 1:5000) are from Jackson ImmunoResearch Laboratories. DAPI (4′,6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, D8417) is from Sigma and was used at 1:2000 for IF.

Mice.

Efnb1^{loxlox}, *Efnb2*^{loxlox} and *Nestin-Cre* mouse lines have been described previously [2-4]. To generate compound mutants, *Efnb1*^{loxlox}; *Efnb2*^{loxlox} females were bred with *Nestin-Cre; Efnb1*^{Ylox}; *Efnb2*^{loxlox} males. Animal procedures were pre-approved by the appropriate Animal Care Committee (MP/07/21/04/11).

Cell lines and treatments.

Human glioma U251, human cervix carcinoma HeLa and human embryonic kidney HEK 293T cell lines were cultured in DMEM-glutamax (61965-059, Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U ml^{-1} penicillin, 100 µg ml^{-1} streptomycin (15140-122, Invitrogen) and 1mM sodium pyruvate (11530-396, Invitrogen) at 37°C in 5% CO_2 in a humidified incubator. Stimulation of forward signaling was obtained by adding pre-clustered recombinant proteins to the culture medium. Pre-clustering was realised by mixing 0.1 µg ml^{-1} goat anti-human IgG (#G-101-C, R & D systems) with 1 µg ml^{-1} recombinant Human IgG1-Fc (#110-HG, R & D systems) for control or recombinant mouse Efnb1-Fc chimera (#473-EB, R & D systems) for effective stimulation, for 1 hour at 37°C in culture medium.

To inhibit Src activity cells were incubated with 5 µM inhibitor PP2 (P0042, Sigma) 1 hour prior to stimulation and PP2 was maintained until the end of the experiments.

Transfections.

Cells were plated one day prior to transfection at a density of 5.10^4 cells ml^{-1} on glass coverslips placed at the bottom of a 12 wells plate or at a density of 2.10^5 cells ml^{-1} on 6 wells plate and 100mm diameter Petri plates. HeLa cells were transfected using Fugene HD (E2311, ROCHE) according to the manufacturer's instructions in OptiMEM (51985-026, Invitrogen) using 0.5 µg plasmid for 12-well plate, 1 ug plasmid for 6-well plate and 5-10 µg for a 100 mm diameter Petri plate. HEK 293T cells were transfected with the Calcium Phosphate procedure using 5 µg plasmid in 1ml Phosphate calcium solution for a 100 mm diameter Petri plate. When co-transfections were performed, total amount of DNA was identical as above with a 1:3 ratio respectively for Eph coding plasmid and co-transfected plasmid.

Immunofluorescence and Flow cytometry.

For immunofluorescence cells were grown and treated as described above on glass coverslips and fixed at room temperature with 2% paraformaldehyde (15710, Electron microscopy) for

20 min, permeabilized and blocked with PBTA solution (0.5% BSA + 0.5% fetal bovine serum + 0.1% Triton X-100 in PBS) for 30 min. Primary and secondary antibodies diluted in PBTA were incubated for respectively 2 h and 45 min at room temperature in a humidified atmosphere and rinsed three times for 1 minute each in successive baths of PBS. Coverslips were mounted on glass slides (Superfrost) using mounting medium (4.8% w/v Mowiol, 12% w/v glycerol in 50 mM Tris pH 8.5).

For flow cytometry cells were grown in 6 well plates and collected with the floating fraction using tryspsin-EDTA 0.25% (Invitrogen) and mechanical dissociation by pipetting. Estimated 1.10^6 cells in 1.2 ml ice cold PBS were fixed by adding slowly 3 ml cold 100% ethanol while vortexing to obtain a 70% final concentration. Incubation procedure with primary and secondary antibodies was as described for immunofluorescence with centrifugation at 2200 rpm for 10 min at each step. Lastly cells were resuspended in 500 µL PI/Rnase solution (550825, BD pharmingen) for 15 min in the dark. Acquisition was performed on a FACsCalibur (Becton Dickinson) with a minimum of 1.10^4 cells analysed with CellQuestPro software (Becton Dickinson).

For analysis of neuronal ploidy, cortex of P0 pups from distinct litters were collected in ice cold PBS-2% BSA, mechanically dissociated and cells were sieved through a 40µm nylon mesh (Greiner 542-040). Cells were washed with ice cold PBS and fixed as described above in 70% ethanol. Incubation procedures with primary (NeuN) and secondary antibodies were as described above. Cells were resuspended in 500µl PI/Rnase (550825 BD pharmingen) solution for 15 min in the dark. Acquisition was performed on a FacsCalibur (Becton Dickinson) with 2.10^5 cells analysed with CellQuestPro software (Becton Dickinson). Debris and doublets were excluded using respectively morphometrics parameters and pulse area parameters from PI emission. To set the threshold of NeuN positive cells, control samples were cells incubated with secondary antibody and PI only. Neuronal DNA content was estimated by analysing PI emission intensity of NeuN positive cells only. Respectively 5 and 3 embryos were analysed for controls (wt, *Efnb1*^{lox}; *Efnb2*^{loxlox}) and mutants (Nes-Cre; *Efnb1*^{lox}, *Efnb2*^{loxlox}).

Live imaging and microscopy.

For live imaging HeLa cells were plated at a density of 2.10^4 cells per well in ImageLock 24-well plates (#4365, Essen Bioscience) and transfected with the mentioned plasmids the following day. Twenty-four hours after transfection cells were synchronised in prophase using

the CDK1 inhibitor Ro-3306 (SLM0569, Sigma) at 10 µM for 18 h and then washed three times with 1ml pre-warmed inhibitor free medium. For stimulation 1 ml medium containing pre-clustered ligands (described above) was then added and plates were immediately loaded into the Incucyte incubator (Essen Bioscience) for live imaging acquisition. Software was calibrated as follows: 3 fields for a well, 1 frame every 10 min for 8 h, autofocus and auto-calibration for green fluorescence. Time taken for plate loading, and software calibration was estimated at about 10 min on the first experiment and included on following experiments before starting acquisition.

Microscope acquisitions were performed either on confocal microscope (Leica SP5) or conventional microscope (Nikon 90i). Cell counting was performed with the use of the ImageJ software and the cell counter Plugin.

Protein extraction, immunoprecipitation and western blot.

For protein extraction, cells were scraped in an ice cold PBS solution, pelleted by centrifugation at 1500 rpm for 5 min and washed once in large volume of ice cold PBS. Pellets were suspended in cold protein lysis buffer (50 mM Hepes pH 7.5 containing 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2.5 mM EGTA, 0.1% Tween 20, 10% glycerol, 1% NP40, 0.5 mM DTT) supplemented with anti-protease (11836170-001, Complete, ROCHE) and anti-phosphatase (04906834-001, PhoStop, ROCHE) for 1 h on ice. Protein lysates were then vortexed, sonicated and centrifuged at 13 000 rpm for 10 min. Cleared lysates were either used for western-blot analyses or processed for Co-Immunoprecipitation assays (co-IP). Co-IP was performed overnight with primary antibodies and 20 µl of prewashed Protein-A beads (Sigma) were added to each tube for the last 45 min. Beads were washed three times in protein lysis buffer and samples were denatured by boiling in loading buffer (4X 100 mM Tris-HCL pH 6.8, 8% SDS, 40% glycerol, 4% β-mercapto ethanol and Bromophenol blue) prior to loading and electrophoresis on a 4-20% SDS-PAGE gel (456-1094, BioRad). Proteins were transfered onto a nitrocellulose membrane (11998905, GE) which was blocked for 30 min and incubated with primary antibody in 5% non fat dry milk in TBS-T (20 mM Tris Base, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20 and adjusted to pH 7.6 with 1 M HCL) overnight at 4°C. Milk was replaced with 5% Bovine serum albumin (04-100-811-C, Euromedex) for detection of phosphorylated epitopes. Western blots presented are representative of at least 3 independent experiments performed on distinct protein lysates.

***In vitro* Kinase Assay.**

For *in vitro* kinase assay HEK 293T cells were transfected with pcDNA6_CRIK_FL_Myc-Histidine tagged plasmid for 48 h in 100 mm Petri plate. The cell monolayer was collected by scraping in ice cold PBS, washed once and the pellet was resuspended in 2 ml 50 mM Hepes pH 7.5 containing 250 mM NaCl, 10% glycerol, 0.5% NP-40, 10 mM Imidazole supplemented with anti-protease (11836170-001, Complete, ROCHE) and anti-phosphatase (04906834-001, PhoStop, ROCHE) for 1 h on ice, then vortexed, sonicated and centrifuged at 13 000 rpm for 10 min. 300µl of Talon beads (#635636, Clontech) were added to the cleared lysate for 90 min on rocker at 4°C. Beads were centrifuged for 3 min at 3000 rpm at 4°C and washed 3 times in 1 ml 50 mM Hepes pH 7.5, containing 300 mM NaCl; 0.05% Tween20 and 20 mM Imidazole. Citron kinase histidine tagged protein was eluted by adding 50 µl washing buffer supplemented with 400 mM Imidazole for 5 min on ice and vortex. Indicated volume of eluate were incubated with 50 ng EphB2 kinase (SRP-0346, Sigma) or 100 ng Src kinase (S1076, Sigma) in 20 µl of kinase buffer (25 mM Hepes pH 7.5 containing 2.5 mM MgCl2, 4 mM MnCl2, anti-protease, anti-phosphatase and 200 µM ATP) for 15 min at 37°C. Controls were included in the experiment by replacing either eluate, ATP or kinases with buffer in the reaction mixture. The reaction was stopped by denaturation in loading buffer (4X 100 mM Tris-HCL pH 6.8, 8% SDS, 40% glycerol, 4% β-mercapto ethanol and Bromophenol blue) and boiling for 10 min. Samples were then loaded and treated as described in the western blotting section.

In-gel tryptic digestion and nanoLC-MS/MS analysis.

For mass spectrometry analysis, histidine-tagged CitK was purified as described above and processed for kinase assay. Samples were reduced, for 30 min at 55°C, by adding in 1X Laemmli sample buffer containing 25 mM DTT, and alkylated in 90 mM iodoacetamide for 30 min in the dark at room temperature. Equal volumes of samples were separated on 4-20% SDS-PAGE. After protein separation, the acrylamide gel was stained using PhastGel Blue R (Sigma) according to the manufacturer's instructions. Bands at expected size (around 230kDa) were excised and subjected to in-gel tryptic digestion using modified porcine trypsin (Promega, France) at 20 ng/µl as previously described [5]. The dried peptide extracts obtained were dissolved in 14 µl of 0.05% trifluoroacetic acid in 2% acetonitrile and analysed by online nanoLC using an UltiMate® 3000 RSLCnano LC system (Thermo Scientific Dionex) coupled to an ETD enabled Orbitrap Fusion™ Tribrid™ mass spectrometer (Thermo Scientific, Bremen, Germany) for an alternative decision tree-driven collision-induced dissociation (CID) / electron transfer dissociation (ETD) fragmentation acquisition [6]. Five µl

of peptide extract were loaded on a 300 µm ID x 5mm PepMap C18 precolumn (Thermo Scientific Dionex) at 20 µl/min in 2% acetonitrile, 0.05% trifluoroacetic acid. After 3 min desalting, peptides were online separated on a 75 µm ID x 15 cm C18 column (packed in-house with Reprosil C18-AQ Pur 3 µm resin, Dr. Maisch ; Proxeon Biosystems, Odense, Denmark). The flow rate was set at 300 nl/min. Peptides were eluted using a 5 to 50% linear gradient of solvent B in 60 min (solvent A was 0.2% formic acid in water and solvent B was 0.2% formic acid in 80% acetonitrile). Survey scans of peptide precursors from 300 to 2000 m/z were performed at 120K resolution (at 200 m/z). Most intense ions per survey scan were selected at 2 m/z with the quadrupole for subsequent data-dependent decision tree-based CID/ETD fragmentation, and the resulting fragments were analyzed by a rapid scan MS analysis in the ion trap. The settings for the data-dependent decision tree-based CID/ETD method were as follows: ETD was performed instead of CID if charge state was 3 and m/z was less than 650, or if the charge state was 4 and the m/z was less than 900, or if the charge state was 5 and the m/z was less than 950. ETD was performed for all precursor ions with charge states > 5. The dynamic exclusion duration was set to 60 s with a 10 ppm tolerance around the selected precursor and its isotopes. Monoisotopic precursor selection was turned on. The instrument was run in top speed mode with 3 s cycles, meaning the instrument would continuously perform MS2 events until the list of nonexcluded precursors diminishes to zero or 3 s, whichever is shorter. For internal calibration the 445.120025 ion was used as lock mass.

Database search and data analysis.

Peak lists extraction from Xcalibur raw files were automatically performed using Proteome Discoverer software (version 1.4.0.288, Thermo Fischer Scientific). The following parameters were set for creation of the peak lists: parent ions in the mass range 300-5000 and no grouping of MS/MS scans. The non-fragment filter was used to simplify ETD spectra with the following settings: the precursor peak was removed within a 4 Da window, charged reduced precursors were removed within a 2 Da window, and neutral losses from charged reduced precursors were removed within a 2 Da window (the maximum neutral loss mass was set to 120 Da). Peak lists were searched against SwissProt mouse database implemented with the His-tagged Citron kinase sequence and using Mascot software (version 2.3.01, Matrix Science, London, UK). Cysteine carbamidomethylation was set as a fixed modification and methionine oxidation, and serine/threonine/tyrosine phosphorylations as variable modifications. Up to three missed trypsin cleavages were allowed. Mass tolerances in MS and

MS/MS were set to 10 ppm and 0.6 Da, respectively. Peptide spectral matches (PSM) were validated using percolator based on q-values at a 5% FDR [7]. With Proteome Discoverer, peptide identifications were grouped into proteins according to the law of parsimony and filtered to 5% FDR. The phosphorylation site localization of identified phosphopeptides was performed by phosphoRS algorithm 3.1 [8] implemented in Proteome Discoverer. Phosphopeptides and phosphoresidue localization were validated by a phosphoRS binomial score >50 and a phosphoRS site probability >75%. Phosphorylated site identification was confirmed by manual interpretation of corresponding MS/MS data.

Quantitative PCR.

RNA was extracted from cell pellets using TRI-reagent according to the manufacturer's instructions. 1 µg RNA was used for reverse transcription. Genomic DNA was degraded with 1 µl DNAse (RQ1, ROCHE) for 20 min at 37°C in 20 µl RNAse, DNAse-free water (W4502-Sigma) and the reaction stopped by adding 1 µl STOP solution under heat inactivation at 65°C for 10 min. Two µl dNTPS (10mM, Promega) and 2 µl oligdTs (100mM, idtDNA) were added for 5 min at 65°C then 8 µl 5X buffer, 2 µl Rnasin (N2511-ROCHE) and 4 µl 100mM DTT (Promega) were added for 2 min at 42°C. The mix was then divided in equal volumes in a RT negative control tube with addition of 1 µl water and in a RT positive tube with 1 µl superscript enzyme (Invitrogen) and placed at 42°C for 1 h. Reaction was stopped at 70°C for 15 min. cDNAs were diluted (10-fold, 100-fold and 1000-fold) and processed for quantitative PCR in triplicate for each dilution. 10 µl diluted cDNAs was mixed with 10 µl premix Evagreen (BTIU31019, VWR) containing 1 µmM of each primers and PCR program run for 35 cycles on a MyiQ BioRad thermocycler. mRNA relative expression levels were calculated using the 2-ddCts method. Primers are listed in Sup. Table 2.

Statistical analysis.

For experiments involving a single pair of conditions, statistical significance between the two sets of data was analysed with a two-tailed, unpaired Student t-test with Prism5 (GraphPad software). For data sets containing more than two samples, one-way ANOVA with a classical Bonferroni multiple comparison post-test was used to determine adjusted P values. Sample sizes of sufficient power were chosen on the basis of similar published research and were confirmed statistically by appropriate tests. Each experiment was performed at least 3 times and 200-1000 cells were counted for each condition of each experiment. Statistically

significant differences are reported at $P<0.05$, $P<0.01$, $p<0.001$ or exact value mentioned on the graphs.

Supplementary References.

1. Serres, M.P. *et al.* p27(Kip1) controls cytokinesis via the regulation of citron kinase activation. *J Clin Invest.* **122**, 844-858 (2012).
2. Davy, A., Aubin, J. & Soriano, P. EphrinB1 forward and reverse signaling are required during mouse development. *Genes Dev.* **18**, 572-583 (2004).
3. Grunwald, I.C. *et al.* Hippocampal plasticity requires postsynaptic ephrinBs. *Nat. Neurosci.* **7**, 33-40 (2004).
4. Tronche, F. *et al.* Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat. Genet.* **99**, 99-103 (1999).
5. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. & Mann, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**, 850-858 (1996).
6. Swaney, D.L., McAlister, G.C. & Coon, J.J. Decision tree-driven tandem mass spectrometry for shotgun proteomics. *Nat Methods* **5**, 959-964 (2008).
7. Brosch, M., Yu, L., Hubbard, T. & Choudhary, J. Accurate and sensitive peptide identification with Mascot Percolator. *J Proteome Res* **8**, 3176-3181 (2009).
8. Taus, T. *et al.* Universal and confident phosphorylation site localization using phosphoRS. *J Proteome Res* **10**, 5354-5362 (2011).

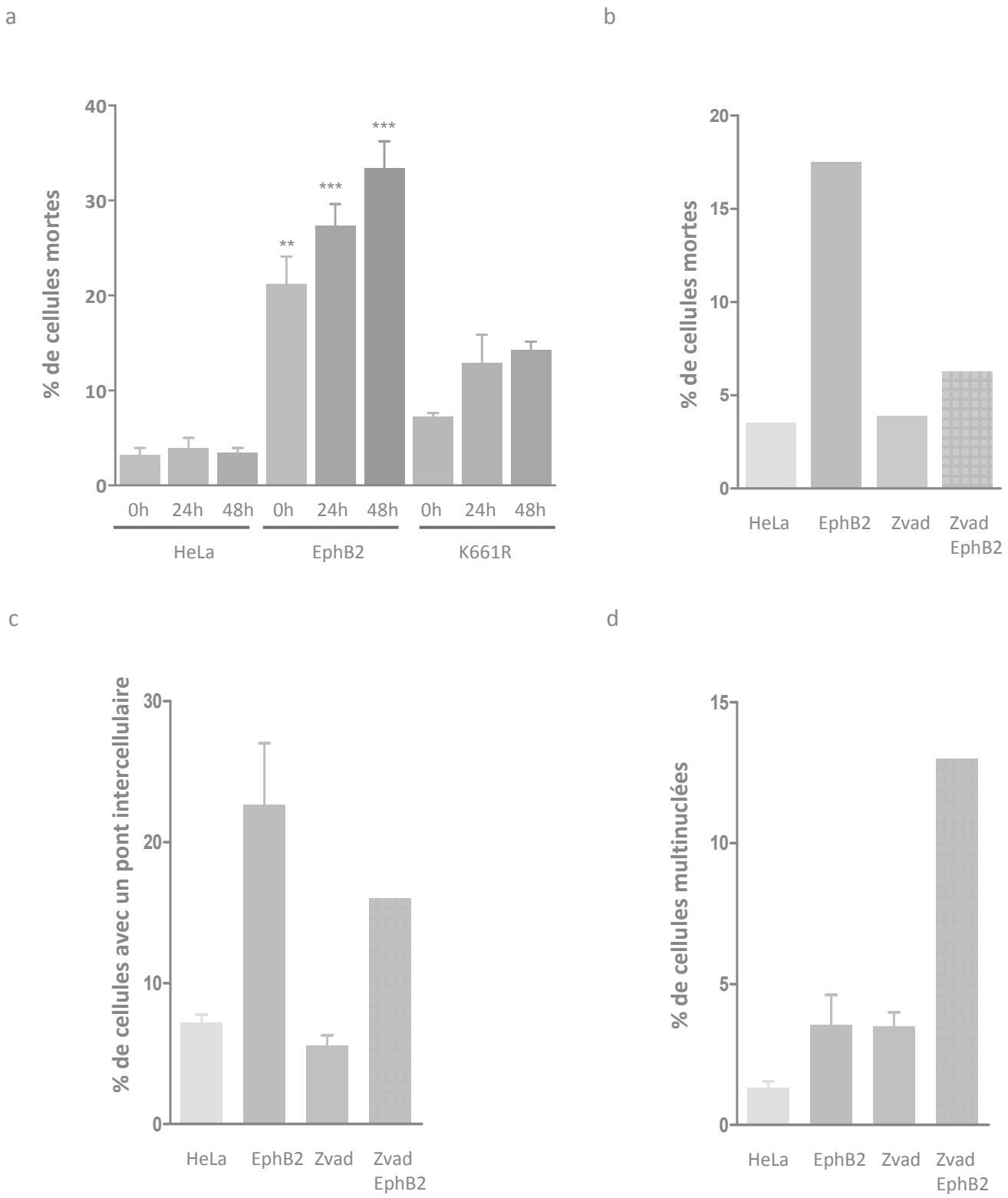


Figure S1:
a- Pourcentage de cellules HeLa mortes détectées par cytométrie de flux et marquage au iodure de propidium (population sub G0). En gris clair à foncé, cellules non transfectées; vert, cellules surexprimant EphB2; bleu, cellules surexprimant EphB2 kinase dead (K661R). Les durées de stimulation par le ligand éphrineB1-Fc sont indiquées en heures. b- Pourcentage de cellules HeLa mortes détectées par cytométrie de flux après 24 heures de stimulation avec le ligand éphrinB1-FC. En gris, cellules non transfectées; en vert cellules surexprimant EphB2; en orange cellules traitées au Zvad; en orange hachuré vert, cellules surexprimant EphB2 et traitées au Zvad. c- Pourcentage de cellules reliées par un pont intercellulaire basé sur un comptage après immunofluorescence. Le code couleur est identique à la figure (b). d- Pourcentage de cellules présentant plus d'un noyau par cytosol après observation en immunofluorescence. Le code couleur est identique à la figure (b). Nota : Aucune analyse statistique de probabilité n'a été réalisée sur les figures b à d, l'échantillonnage étant insuffisant.

2. Effet à long terme du défaut de cytocinèse induit par la voie Eph forward : l'aneuploïdie ou l'apoptose

Lors des analyses de la ploïdie des cellules HeLa par cytométrie de flux nous avons également observé une forte mortalité cellulaire induite par la seule expression du récepteur EphB2 (20%), sans stimulation, contre 4% dans les conditions contrôles sans surexpression du récepteur (figure S1a, respectivement colonne vert clair et colonne gris clair). Cette mort cellulaire est connue et implique largement la voie autophagique (Chukkapalli et al., 2014; Kandouz et al., 2010). Elle reflète entre autre l'autophosphorylation des récepteurs lorsqu'ils sont fortement concentrés à la membrane et qui n'existe pas dans le cadre de la surexpression d'un récepteur kinase-dead (EphB2-K661R) et dont la mortalité est voisine des conditions contrôles (7%) (figure S1a, colonne bleu clair). Nous avons également pu observer par cytométrie de flux qu'environ 27% et 34% des cellules surexprimant EphB2 et stimulées par le ligand éphrineB1-fc sont mortes après respectivement 24 et 48 heures de stimulations (figure S1a, colonnes vertes). Lorsqu'on surexprime le récepteur EphB2 dépourvu d'activité kinase (K661R) on observe respectivement 12% et 15% de mortalité cellulaire après respectivement 24 et 48 heures de stimulation par le ligand et la différence n'est pas statistiquement significative par comparaison à la condition non stimulée (respectivement 6% et 5% contre 4%) (figure S1a, colonnes bleues). Ces résultats démontrent que l'activité kinase des récepteurs EphB2 peut induire la mort cellulaire.

Les défauts de cytocinèse aboutissent pour partie à des cellules polyploïdes (manuscrit, figure 1e) mais lorsque les systèmes de contrôle sont fonctionnels, beaucoup de ces cellules sont alors orientées vers la mort cellulaire (figure S1a) (Joshi et al., 2011). Afin d'estimer la proportion de mort cellulaire induite consécutivement aux défauts de cytocinèse par rapport à celle induite indépendamment, nous avons envisagé de bloquer la mort cellulaire de ces cellules en parallèle de l'activation de la voie Eph à l'aide d'un inhibiteur de l'apoptose, le Zvad-fmk (figure S1b-d). Après analyse par cytométrie de flux nous avons pu observer dans des résultats préliminaires que le Zvad était efficace dans nos conditions expérimentales pour inhiber la mort cellulaire induite par la signalisation EphB2 (figure S1b). Cette inhibition de la mort cellulaire ne semble en outre ne pas avoir d'incidence majeure sur la proportion de cellules présentant une persistance de leur pont intercellulaire (figure S1c). Par contre, la

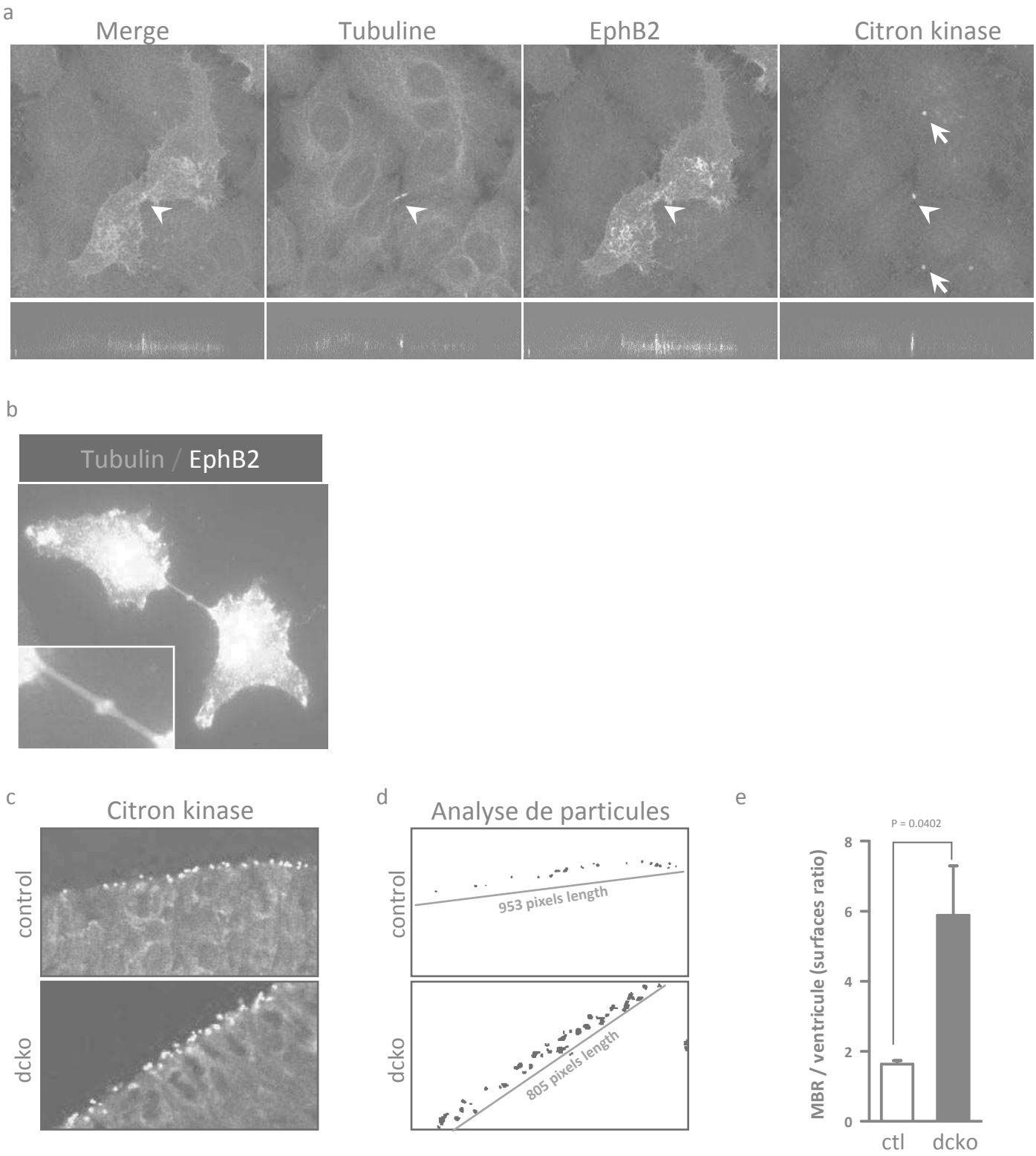


Figure S2:

a- Immunofluorescence de cellules HeLa surexprimant le récepteur EphB2. Merge, couleurs superposées; bleu, anti-tubuline, second panneau; vert, anti-EphB2, troisième panneau; rouge, anti-citron kinase, quatrième panneau. Panneaux du bas, Z acquisitions respectives au niveau du pont intercellulaire. b- Immunofluorescence d'une cellule HeLa surexprimant le récepteur EphB2 en fin de cytocinèse. Rouge, tubuline; blanc, EphB2. L'abscission asymétrique est visible dans l'encart de grossissement tout comme la présence d'EphB2 au MBR. c- Immunofluorescence d'une coupe de cortex à E13,5 jours de développement. Control = *efnb1*^{Ylox}; *efnb2*^{loxlox}. Dcko = *Nes:Cre*; *efnb1*^{Ylox}; *efnb2*^{loxlox}. d- Images de l'analyse de particules faite à l'aide du logiciel ImageJ. En bleu, longueur en pixels de la zone d'analyse. e- Représentation graphique de la surface couverte par les particules positives pour citron kinase rapportée à la longueur de la zone ventriculaire mesurée. Colonne blanche : *efnb1*^{lox}; *efnb2*^{loxlox}. Colonne noire : *Nes:Cre*; *efnb1*^{lox}; *efnb2*^{loxlox}. n = 3 embryons pour chaque groupe.

proportion de cellules multinuclées, après 48 heures de stimulation de la voie EphB2 forward et traitement au Zvad, est de 13% dans ces conditions contre seulement 4% dans les conditions de stimulation d'EphB2 seul ou de traitement au Zvad seul (figure S1d). Cette dernière analyse démontre donc qu'une partie des cellules présentant des défauts de cytocinèse en aval de la voie Eph est éliminée par mort cellulaire dans notre système. Si les mécanismes d'induction de cette mort cellulaire sont contournés, comme par exemple ici avec l'utilisation d'un inhibiteur, ces cellules sont alors polyploïdes.

3. EphB2 est exprimé au niveau du midbody et la voie Eph :éphrine modifie la présence du MBR en partie apicale de la zone ventriculaire durant la neurogénèse

Au cours de nos expérimentations nous avons voulu observer la localisation du récepteur EphB2 durant la cytocinèse. Nous avons surexprimé le récepteur EphB2 dans des cellules Hela et réalisé des immunomarquages contre la tubuline, EphB2 et citron kinase. Nous avons pu observer que dans des cellules en cytocinèse, surexprimant EphB2 mais non stimulées par les ligands, la tubuline présente un marquage caractéristique du cytosquelette et du pont intercellulaire avec la présence d'une zone dépourvue de microtubules au centre de ce pont (figure S2a, deuxième panneau). Les récepteurs EphB2 sont répartis de manière uniforme sur toute la surface de la cellule, y compris au niveau du pont intercellulaire (figure S2a, troisième panneau). Enfin, citron kinase est normalement enrichi et séquestré au centre du pont intercellulaire (figure S2a, quatrième panneau et tête de flèche). Nous avons également observé la présence à la surface des cellules de MBR, positifs pour citron kinase (figure S2a, quatrième panneau et flèches). Nous avons également réalisé une analyse en Z en microscopie confocale afin de confirmer la colocalisation au centre du pont intercellulaire d'EphB2 et citron kinase (figure S2a, panneaux du bas). Nous avons également pu observer la localisation du récepteur EphB2 dans une cellule dont l'abscission asymétrique a débuté comme le prouve l'interruption dans le marquage tubuline, sur la partie droite du pont intercellulaire (figure S2b, rouge). Nous avons alors constaté que nous pouvions toujours détecter un immunomarquage pour EphB2 au niveau du midbody résiduel, le futur MBR (figure S2, blanc) laissant supposer que les MBR peuvent contenir des molécules de récepteurs Eph.

Les progéniteurs neuraux murins expriment de manière endogène les récepteurs Eph et les ligands éphrineB1 et éphrineB2 (Arvanitis et al., 2013). Nous avons générés des souris KO

conditionnelles excisant spécifiquement *éphrineB1 et B2* dans les progéniteurs neuraux, par une approche Cre-Lox. Nous avons collectés des cerveaux d'embryons issus de ces croisements à 13,5 jours de développement, durant la neurogénèse embryonnaire et réalisé un immunomarquage contre la protéine endogène Citron kinase (figure S2c). Après observation en microcopie confocale il semble que la taille et le nombre de particules affleurant la zone ventriculaire apicale soit différent entre les individus contrôles et les individus mutants. A l'aide du logiciel ImageJ, nous avons réalisé une analyse de particules le long de cette zone ventriculaire et avons déterminé un nombre et une surface occupés par ces particules (figure S2d). Cette surface a été rapportée à la longueur de la zone ventriculaire analysée et reflète donc la densité de particules positives pour Citron kinase présentes à la surface apicale des progéniteurs neuraux embryonnaires (figure S2d et S2e). Nous avons ainsi pu observer que la perte d'expression des ligands éphrineB1 et éphrineB2 qui génère une perte de signalisation Eph dans les progéniteurs apicaux durant la neurogénèse, induit une augmentation de MBR en zone apicale (figure S2e).

4. Le rôle de la voie Eph forward sur la cytocinèse est également observable chez les invertébrés

En sus de pouvoir valider des observations faites chez les mammifères dans un système invertébré, nous souhaitions éventuellement utiliser le modèle des cellules de Drosophile pour réaliser ultérieurement un crible génétique afin d'identifier des acteurs moléculaires en aval de la voie dEph.

Le génome de *D. melanogaster* est composé d'environ 13000 gènes contre 30000 chez l'homme. De plus chez *D. melanogaster* il ne peut y avoir de redondance fonctionnelle éventuelle des Eph ou des éphrines car il n'existe qu'un membre de chaque famille contrairement aux mammifères. Enfin les cellules de Drosophile sont couramment utilisées dans des cribles à grande échelle notamment pour leur efficacité à répondre à la technologie d'ARN interférence et l'existence de banques génome wide (Mohr et al., 2014). Chez la Drosophile, les orthologues des récepteurs Ephs et des ligands éphrines sont respectivement dénommés dEph et déphrine. Comme chez les vertébrés, dEph possède dans sa partie extracellulaire un domaine globulaire, une région riche en cystéine et deux répétitions d'unités de fibronectine III. Il contient également dans sa partie juxtamembranaire des résidus tyrosines conservés connus pour assurer l'autophosphorylation des récepteurs chez

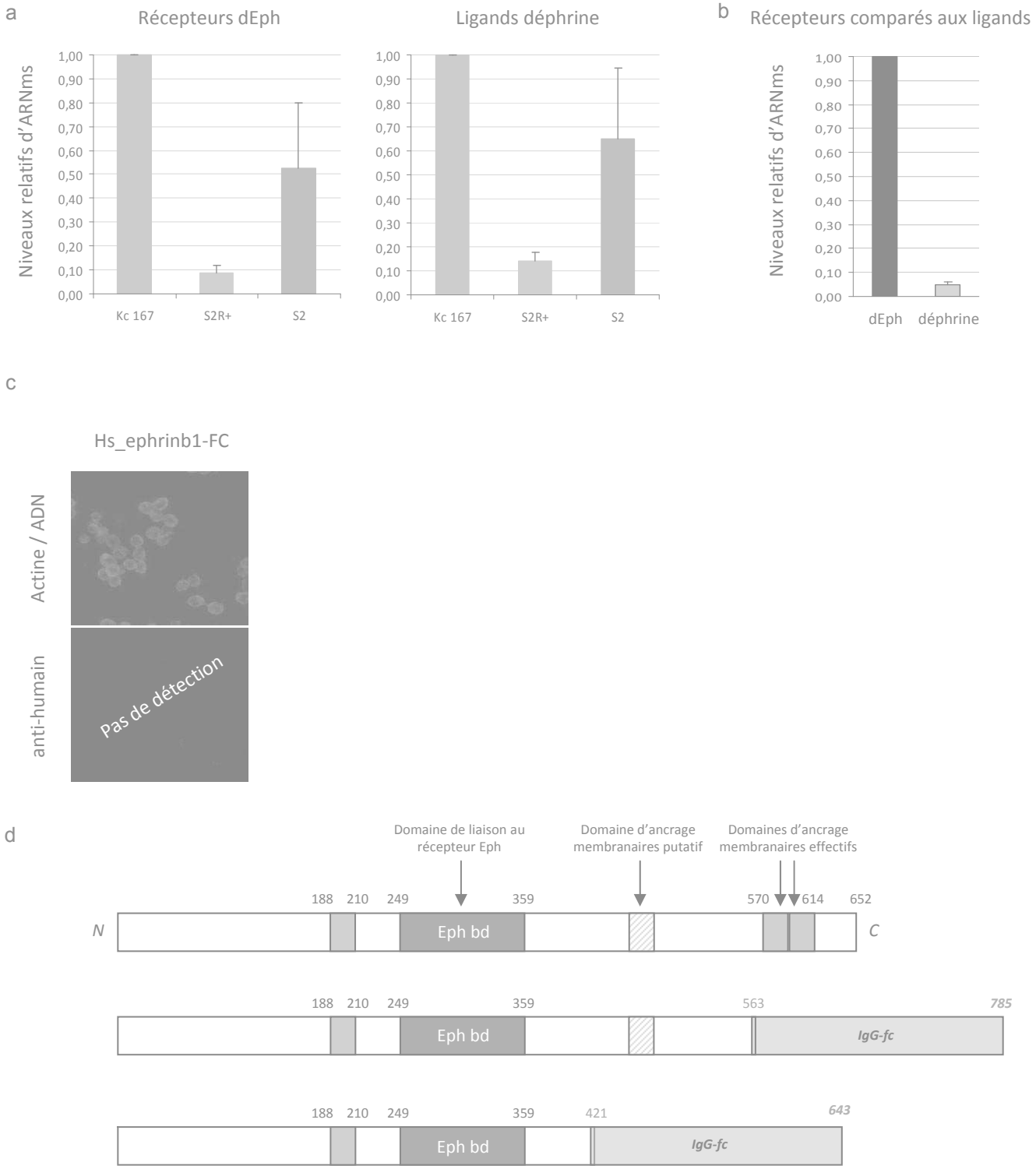


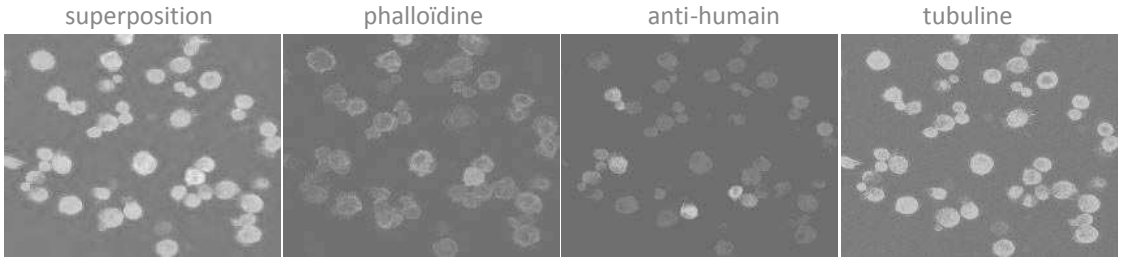
Figure S3:
a- Niveaux d'expression relatifs des ARN messagers codant les protéines dEph (panneau de gauche) ou déphrine (panneau de droite), comparés au gène de standardisation RP49 dans 3 lignées cellulaires de Drosophile. En vert, cellules Kc167; en bleu, cellules S2R+; en violet, cellules S2. b- Niveaux d'expression relatifs des ARN messagers des récepteurs dEph (barre noire) comparé aux ligands déphrine pour les 3 lignées cellulaire (barre grise). c-Immunofluorescence sur cellules S2, stimulées avec éphrineb1-fc pendant 45 minutes. L'absence de signal dans le panneaux du bas évoque une absence de liaison entre les récepteurs endogènes et le ligand humain. d- Stratégie de clonage utilisée pour produire des ligands chimériques solubles de déphrine. En haut, structure de la protéine endogène. Au centre, ligand chimère déphrine563-fc tronqué de la partie c-terminale en position 563 et flanqué du domaine FC humain. En bas, ligand chimère déphrine421-fc tronqué de la partie c-terminale en position 421 et flanqué du domaine FC humain. Les chiffres correspondent aux numéros d'acide aminés.

les mammifères, un domaine kinase, un domaine SAM et un domaine putatif de fixation des protéines à PDZ. Si l'on compare l'homologie de séquence en acides aminés des domaines extracellulaires entre dEph et les récepteurs Eph des mammifères, elle est de 32% avec le récepteur EphA3 humain et de 35% avec le récepteur EphB2. Quant à la région cytoplasmique de dEph son homologie de structure est de 71% avec EphA3 et EphB2 (Scully et al., 1999). Le ligand déphrine peut lui être davantage apparenté à la classe B des éphrines chez les mammifères car il comporte dans sa partie intracellulaire une queue cytoplasmique. Sa conservation de domaine extracellulaire avec les mammifères est très faible, le domaine de liaison au récepteur étant précédé de près de 200 acides aminés sans aucune homologie de structure (Bossing and Brand, 2002). Le domaine c-terminal de déphrine comporte deux domaines d'ancrage putatif à la membrane plasmique, dont un seul a pour l'instant été démontré comme fonctionnel, et un domaine cytosolique d'une trentaine d'acides aminés (Bossing and Brand, 2002). Comme chez les mammifères, la signalisation Eph-éphrine a été impliquée dans le guidage axonal chez la drosophile (Boyle et al., 2006).

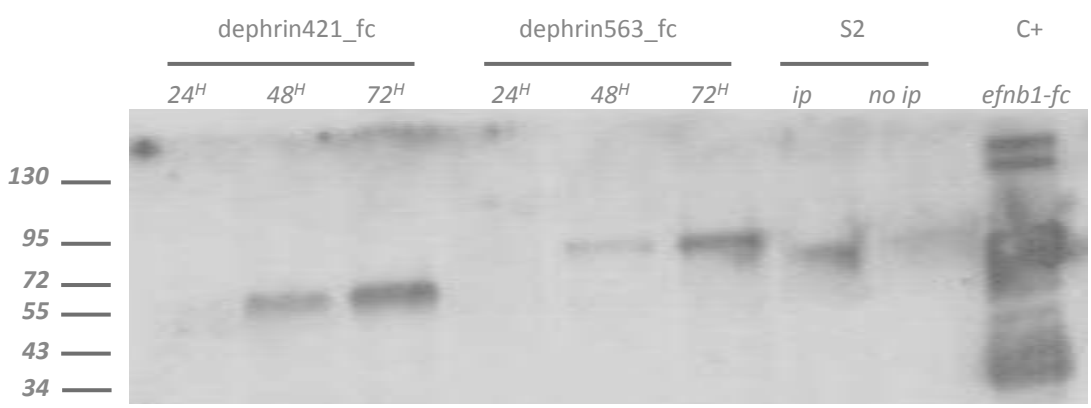
Nous avons voulu vérifier si dEph et déphrines étaient exprimés dans les lignées cellulaires de Drosophile utilisées en routine au laboratoire. Nous avons testé 3 lignées distinctes par RT-PCR quantitative afin de détecter les ARN messagers codant ces protéines. La figure S3a représente les niveaux d'expression relatifs que nous avons pu observer à la fois pour le récepteur dEph (graphique de gauche) et pour le ligand déphrine (graphique de droite) comparativement à un gène ribosomal exprimé de manière ubiquitaire dans les cellules, RP49. Suite à cette analyse nous avons exclu la lignée cellulaire S2R+ de nos travaux car les niveaux d'expression de dEph et déphrine dans cette lignée semblent faibles. Nous avons aussi pu constater que les niveaux d'expression du ligand endogène sont en moyenne 20 fois inférieurs à ceux du récepteur au niveau des ARNms (figure S3b).

Nous disposons au laboratoire de protéines chimériques pour le ligand éphrineb1 humain. Nous avons testé la fixation de ce ligand aux récepteurs endogènes. Après fixation nous avons réalisé une immunofluorescence dirigée contre le fragment constant du ligand éphrineb1-fc (anti-humain couplé à un fluorochrome), l'actine de la cellule (phalloïdine) et le noyau (DAPI). Nous avons conclu de l'absence de signal pour le marquage anti-humain que les cellules S2 et Kc167 n'étaient pas capable de fixer efficacement le ligand chimériques humains (figure S3c), comme attendu au vue des analyses d'homologies de domaines entres les protéines orthologues. Nous avons donc construit des ligands chimériques à partir de la séquence de la protéine déphrine (figure S3d, haut). Nous souhaitions pouvoir produire ces protéines chimères avec les éventuelles modifications endogènes (glycosilation notamment) dans les cellules S2. De façon similaire aux stratégies couramment utilisées chez les

e

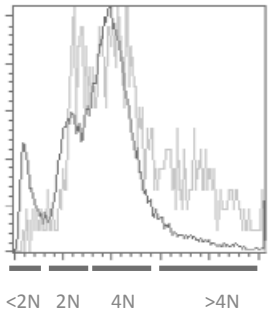


f



IB : anti-humain

g



h

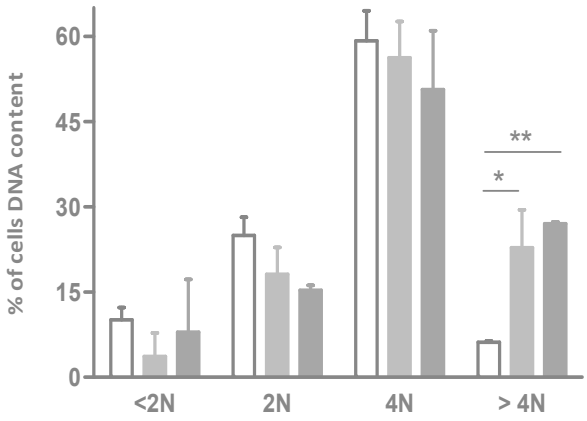


Figure S3:
e- immunofluorescence de cellules S2 transfectées avec le plasmide codant la protéine chimère déphrine563-fc. Le taux de cellules positives pour l'anticorps anti-humain est estimé à 20%. f- Immunoblot de surnageant de cultures après co-immunoprécipitation à l'aide de billes de sépharose couplées à la protéine G. Les heures indiquées correspondent aux durées de culture post-transfection. Le marqueur de taille à gauche est exprimé en kilo Daltons. Le contrôle (C+) correspond à un dépôt de protéine chimérique commerciale couplée au FC. Les pistes S2 correspondent à du surnageant de culture issu de cellules non transfectées soumise à co-immunoprécipitation (ip) ou non (no ip). g- Exemple de diagramme obtenu après analyse en cytométrie de flux et marquage au Iodure de propidium. Courbe noire = cellules S2. courbe verte = cellules S2 stimulées avec du surnageant de culture de cellules S2 transfectées avec déphrine421-fc. h- Analyse de la ploïdie des cellules S2 par cytométrie de flux après stimulation ou non pendant 48 heures. Barres blanches, cellules stimulées avec du surnageant de cellules non transfectées; barres vertes, cellules stimulées avec du surnageant de culture de cellules transfectées avec déphrine421-fc; barres bleues, cellules stimulées avec du surnageant de culture de cellules transfectées avec déphrine563-fc.

vertébrés, nous avons couplé ces protéines chimériques au fragment constant humain afin de pouvoir les détecter. Nous avons également souhaité que ces protéines chimériques soient solubles et secrétées, pour pouvoir les purifier à partir des surnageants de culture (figue S3d). Basé sur les travaux de l'équipe d'Andrea Brand (Bossing and Brand, 2002), nous avons construit une protéine chimérique contenant la partie extracellulaire de déphrine couplé au fragment constant humain. L'existence d'un site d'ancrage membranaire putatif (à partir de la position 421 en Aa) en plus du site fonctionnel (à partir de la position 563 en Aa) dans le domaine c-terminal de déphrine nous a conduits à réaliser deux constructions distinctes codant des protéines plus ou moins tronquées. Le fragment fc humain a été cloné dans le cadre de lecture après l'Aa 421 ou l'Aa 563 (figure S3d).

Nous avons transfecté ces protéines chimères dans des cellules S2 et avons vérifié l'expression des plasmides et la production des protéines chimères par immunomarquage des cellules (figure S3e). Environ 20% des cellules expriment les protéines chimères 48 heures après transfections. Pour vérifier si nos protéines chimériques étaient sécrétées nous avons collecté les surnageants de ces cultures après 24, 48 et 72 heures de transfections, réalisé une immunoprécipitation contre les fragments constant puis une électrophorèse de protéines. L'immunodétection à l'aide d'un anticorps anti-humain a mis en évidence que les deux constructions chimériques étaient bien sécrétées et accumulées dans les surnageants de cultures (figure S3f).

Afin de tester la fonctionnalité de ces protéines, nous avons stimulé des cellules S2 avec du surnageant de culture contenant les protéines chimériques, pendant 40 heures. Sur un schéma expérimental similaire à l'équipe du Dr. Taipale (Bjorklund et al., 2006), les cellules ont été analysées par cytométrie de flux et leur contenu en ADN évalué par l'incorporation d'Iodure de propidium. Les cellules présentant un marquage positif pour l'anticorps anti-humain ont été comparées aux cellules négatives et aux cellules stimulées avec du surnageant contrôle (figure S3g). Cette analyse prouve tout d'abord que les cellules S2 sont capables, via leurs récepteurs endogènes, de fixer les ligands chimériques (environ 10% de cellules positives pour le marquage anti-humain). Nous avons de plus observé, que respectivement 20 et 25 % de cellules S2 étaient polyploïdes après stimulation avec déphrine421-fc et déphrine563-fc contre 6% dans les conditions contrôle (figure S3h). Nous avons ainsi pu mettre en évidence que des défauts de ploïdie apparaissent lorsque la signalisation dEph forward endogène est stimulée dans un système invertébré. Il apparait donc éventuellement envisageable de réaliser avec nos outils un crible d'ARN interférence pour identifier de nouveaux acteurs en aval de la voie dEph.

Discussion-Perspectives

La phosphorylation tyrosine de citron kinase : un disjoncteur au service de l'abscission

Nous avons démontré qu'il existait une corrélation entre la phosphorylation de Citron kinase, son enrichissement au midbody et la réalisation de l'abscission. Cette phosphorylation est présente sur des résidus tyrosines localisés dans le domaine RBD de citron kinase. Ce domaine RBD est actuellement décrit comme suffisant pour réaliser la transition de la constriction de l'anneau de clivage vers l'abscission (Watanabe et al., 2013). Il est également décrit comme nécessaire à la stabilité du pont en permettant l'ancrage de la membrane avec les microtubules par la formation d'un complexe dont citron kinase apparait comme l'élément central (Bassi et al., 2013; Watanabe et al., 2013). On peut donc légitimement supposer que simultanément à l'abscission, la stabilité engendrée par ce complexe doit être atténuée. La phosphorylation de citron kinase pourrait modifier l'interaction de son domaine RBD avec ses partenaires directs KIF14 et PRC1 du côté de l'ancrage aux microtubules et RhoA et Annilline du côté de l'ancrage cortical. Nos résultats suggèrent que la phosphorylation de citron kinase en fin de cytocinèse servirait de disjoncteur à la dissociation des composants central du midbody pour faciliter la rupture membranaire réalisée par la machinerie ESCRT. La kinase Src, localisée au midbody participerait à ce processus.

Cette hypothèse peut être soutenue par l'étude de Soeda Shuhei et ses collaborateurs qui décrivent qu'une surexpression de v-Src engendre une délocalisation de MKLP1, un des membres du complexe stabilisateur au midbody avec Citron kinase, au niveau du midbody (Soeda et al., 2013). Il est tentant de postuler que dans cette étude, la délocalisation de MKLP1 pourrait être le résultat de la rupture de l'interaction avec Citron kinase, suite à sa phosphorylation par la kinase Src.

De plus, deux analyses indépendantes à grande échelle ont démontrées que la phosphorylation de citron kinase sur le résidu tyrosine 1237 était physiologique. Ces analyses ont été faites sur des cerveaux de souris adultes (Ballif et al., 2008; Wisniewski et al., 2010). Or le cerveau est un des organes dans lequel citron kinase est préférentiellement exprimé, qui plus est sous sa forme dépourvue d'activité kinase, et a un rôle majeur (Di Cunto et al., 2000).

Cette hypothèse est également soutenue par nos propres travaux. Nous avons montré une corrélation forte entre la phosphorylation de citron kinase sur tyrosine et les défauts d'abscission (manuscrit, figure 1g, 1e, 2a). Nous avons également montré, à la différence des domaines RBD de citron kinase sauvage (F3) et phospo-dead (F3Y>A), que le domaine RBD de citron kinase phospho-mimétique (F3Y>E) surexprimé dans des cellules HeLa était suffisant pour induire des défauts d'abscission (manuscrit, figure 4b). De plus, si les domaines RBD de citron kinase sauvage (F3) et phospo-dead (F3Y>A) sont suffisants pour sauver les défauts d'abscission induits par EphB2, le domaine phospho-mimétique (F3Y>E), ne l'est pas (manuscrit, figure 4c). Je propose donc que lorsque Src est activée, en aval d'EphB2, la protéine citron kinase endogène peut être phosphorylée. Si cette proportion de protéine phosphorylée comparativement à la proportion de protéine native dépasse un certain seuil ET si la cellule est en cytocinèse, alors citron kinase ne s'associe pas correctement à ses partenaires au midbody, est délocalisée (manuscrit, figure 2a) et l'abscission est retardée (manuscrit figure 1g) ou inachevée (manuscrit, figure 1d et 1e). La surexpression du domaine RBD de citron kinase non phosphorylable (F3Y>A), malgré la phosphorylation sur tyrosine d'une partie de la protéine citron kinase endogène, rétablirai la formation du complexe des partenaires au midbody et donc le déroulement correct de l'abscission (manuscrit, figure 4c). La surexpression du domaine RBD de citron kinase sauvage (F3) permet également de rétablir un ratio favorable entre fraction phosphorylée et non phosphorylée de citron kinase, suffisant pour achever l'abscission (manuscrit, figure 4c). Par contre la surexpression du domaine RBD pospho-mimétique ne peut pas exercer cet effet tampon voire aggrave la dissociation du complexe au midbody et augmente la pénétration des défauts d'abscission (manuscrit figure 4c et 4b).

Pour vérifier cette hypothèse il faudrait pouvoir suivre la dynamique de phosphorylation de citron kinase durant la cytocinèse à l'aide par exemple d'un anticorps spécifique des 2 épitopes tyrosines phosphorylés du domaine RBD de citron kinase. Il faudrait également vérifier que le fragment phosphomimétique du domaine RBD de citron kinase que nous avons décrit comme suffisant pour induire des défauts d'abscission, n'est plus capable de lier ses partenaires listés ci-dessus.

Un rôle de la voie Eph :ephrine dans la diffusion/dégradation du remnant et la neurogénèse embryonnaire

L'abscission aboutit à la séparation des deux cellules filles par clivage du pont intercellulaire et génère un « résidus » d'abscission, en anglais remnant, qui se compose du midbody intact. Ce vestige de l'abscission à longtemps été considéré comme un reliquat transitoire soumis à une dégradation ultérieure (Buck and Tisdale, 1962; Mullins and Biesele, 1977). Aujourd'hui le MBR (Midbody Remnant) est considéré avec beaucoup d'attention car cette structure peut soit être héritée de manière asymétrique par l'une des deux cellules filles, soit être diffusée à plus longue distance (Crowell et al., 2014).

Il existe un nombre croissant d'études qui établissent des corrélations entre la présence du MBR dans une cellule et le devenir de cette cellule. Ainsi, les particules qui persistent dans l'environnement immédiat des progéniteurs neuraux apicaux ventriculaires, ont été identifiées comme des MBR en dégradation. (Marzesco et al., 2005). Ces mêmes particules présentes dans des cellules épithéliales sont enrichies en protéine prominin-1 (CD133) (Florek et al., 2005). L'accumulation de ces particules riches en prominin-1 augmente avec la progression de la neurogénèse dans l'embryon et il a donc été proposé que ces particules issues de la dégradation du MBR pourrait agir comme des molécules de signalisation inter cellulaire dans le choix du mode de division (Marzesco et al., 2005). Depuis l'émergence de cette hypothèse, deux études ont également décrits un rôle potentiel du MBR dans la polarité des neurones : la première chez la Drosophile dans laquelle les auteurs proposent que l'héritage du fuseau résiduel de mitose soit un marqueur précoce de la polarité neuronale et définisse le site d'émergence du futur axone (Pollarolo et al., 2011); la seconde étude, réalisée chez C. elegans propose que le MBR serve de plateforme d'ancrage dans la rotation du centrosome maternel et donc dans la mise en place de l'axe Dorso-ventral au stade 2/4 cellules (Singh and Pohl, 2014).

Il a également été décrit que certains types cellulaires diffusent et captent le MBR différemment. Les cellules souches comme les cellules cancéreuses diffusent plus facilement le MBR que les cellules différenciées et en héritent également plus fréquemment (Crowell et al., 2013; Ettinger et al., 2011; Kuo et al., 2011). Si l'on altère la libération du MBR dans certains types cellulaires on augmente leur réponse aux stimuli induisant leur différenciation (Ettinger et al., 2011). Cette accumulation de MBRs dans les cellules souches serait la conséquence à la fois d'un héritage préférentiel post-abscission et d'une inhibition de leur dégradation par une autophagie faible dans ces cellules (Kuo et al., 2011). L'activation de la dégradation du MBR s'accompagne également d'une augmentation de la différenciation des cellules (Kuo et al., 2011) et l'augmentation artificielle de l'accumulation du MBR par prévention de l'autophagie, augmente les capacités de reprogrammation des cellules en

cellules souches (Ettinger et al., 2011). Ces observations abondent donc elles aussi pour un rôle potentiel du MBR dans le choix du mode de division des cellules.

Il est cependant difficile de considérer l'héritage du remnant comme un déterminant absolu dans le destin des cellules filles. Cette théorie apparait peu compatible avec l'existence de divisions symétriques proliératives, qui assurent le maintien du pool de cellules souches, et au cours desquelles seule une des deux cellules filles hérite du remnant alors que les deux cellules filles sont de destins similaires. De plus, les cellules cancéreuses dérivent préférentiellement de population de cellules souches ou progénitrices davantage que de cellules en différentiation terminale ce qui pourrait expliquer leur affinité pour l'accumulation du MBR. Néanmoins il a été décrit une corrélation étroite entre des cellules cancéreuses accumulant plus ou moins de MBR et leur pouvoir tumorigène, les cellules les plus riches en MBRs étant davantage pathogènes que les cellules faiblement enrichies pour une même lignée cellulaire (Kuo et al., 2011).

Pourquoi et comment les cellules retiennent plus ou moins le MBR ? Quels constituants du MBR sont reconnus par les cellules comme molécule de signalisation ? Pourquoi certaines cellules font le choix de dégrader ou pas le MBR ? Tous les MBR sont ils identiques dans leur composition ?

Nous avons accumulé des données préliminaires qui m'invite à postuler <u>un rôle de la signalisation Eph:éphrine dans la diffusion et/ou la captation et/ou la dégradation du MBR</u>.

En effet, nous avons pu montrer qu'EphB2 est exprimé au niveau du midbody jusqu'à l'étape ultime de l'abscission (Figure S2a et b). En outre, durant la neurogénèse une proportion forte de MBR se retrouve affleurant la membrane apicale des progéniteurs neuraux (Figure S2c) et libérée dans le fluide céphalo-rachidien (Ettinger et al., 2011; Sykes and Huttner, 2013). Chez les individus dont la voie Eph forward endogène est altérée la présence de ces MBR au niveau de la membrane apicale de la zone sous ventriculaire semble amplifiée (Figure S2 c-e).

Si l'on confirme la présence des récepteurs Ephs endogène dans les MBR, on peut envisager que la dégradation d'un MBR par une cellule soit modulée par l'interaction entre la voie Eph et l'autophagie déjà largement décrite (Chukkapalli et al., 2014; Kandouz et al., 2010). On peut aussi supposer qu'un MBR positif pour les récepteurs Ephs facilite l'endocytose par des cellules exprimant les ligands éphrines et soit un modulateur de la captation préférentielle des MBR par certains types cellulaires (Irie et al., 2005). Enfin, il serait intéressant de confirmer la diffusion différentielle des MBR dans le liquide céphalo-rachidien en fonction du niveau d'expression des Ephs et éphrines. Il serait alors intéressant d'étudier le devenir des

cellules progénitrices neurales baignées dans un environnement enrichie en MBR exprimant ou non Eph:éphrine.

Un rôle de la voie Eph:ephrine dans l'initiation des gliomes via l'aneuploïdie

D'une manière générale le rôle de la signalisation Eph-éphrine dans l'agressivité des cancers du cerveau, les gliomes ou glioblastomes, a été attribué à des modifications des propriétés migratoires et invasives des cellules, via des régulations du cytosquelette et de la matrice extracellulaire. Le rôle de la signalisation EphB-éphrineB a cependant été moins étudié que celui de la signalisation EphA-éphrineA. Pourtant, tout les ligands éphrineBs sont surexprimés dans les gliomes (Nakada et al., 2010; Nakada et al., 2006) alors que les ligands éphrineAs sont eux généralement sous-exprimés (Li et al., 2009; Liu et al., 2007). EphrineB2 et éphrineB3 ont été largement décrits comme ligands capables d'interagir par contact cellule-cellule avec le récepteur EphB2. Le récepteur EphB2 est quant à lui le récepteur le plus surexprimé dans les gliomes fortement invasifs et son niveau d'expression corrèle avec un mauvais pronostic vital pour les patients (Nakada et al., 2004; Sikkema et al., 2012; Wang et al., 2012). De plus il existe une forte dichotomie fonctionnelle pour EphB2 en fonction du microenvironnement qui peut soit agir comme suppresseur de tumeur, soit agir comme promoteur de tumeur et contrôler à la fois la prolifération et la migration des cellules tumorales (Wang et al., 2012). Enfin, il a été récemment démontré qu'EphB2 était suffisant pour contrôler l'apparition de sphères tumorales (Gao et al., 2014).
Nous avons confirmé que les récepteurs EphBs étaient exprimés dans des lignées de gliome, U251 (manuscrit fig S1a) et que la signalisation Eph forward dans ces cellules induits des défauts de cytocinèse (manuscrit fig 1a). Nous avons également des données préliminaires (non présentées) qui nous indique que les niveaux d'expression en ARNm des récepteurs Ephs sont supérieurs dans les cellules de gliomes comparativement à des cellules souches neurales primaires murines en culture. Nous pourrions donc supposer que l'augmentation des niveaux d'expression des récepteurs Ephs ne soit pas seulement une conséquence du processus de tumorisation mais puisse être un acteur de tumorigénèse en favorisant l'aneuploïdie et l'instabilité génétique dans un tissu initialement sain. L'instabilité génétique liée à l'aneuploïdie des cellules souches a déjà été proposée comme source de cancers du cerveau chez l'enfant (Iourov et al., 2009b). De plus, dans une lignée cellulaire de glioblastome , le processus de tumorigénèse a été attribué à des défauts de cytocinèse et de l'aneuploïdie (Telentschak et al., 2015).

Eph :ephrine acteurs de l'environnement local et de la diversité neuronale chez l'adulte

Les fonctions cognitives complexes, avantage des mammifères supérieurs et fruit de l'évolution de millions d'années, seraient directement influencées par la richesse et la diversité neuronale du cerveau (Koch and Laurent, 1999). Ainsi le cerveau des souris serait composé de près de 75 millions de neurones et celui de l'homme d'une centaine (Williams, 2000). Le nombre de synapses, supports de l'information neuronale et de la richesse du circuit neuronal, serait de 5000 à 200 000 synapses par neurones, soit une estimation du nombre de connexions neuronales qui donne le vertige (10^{15} synapses…) (Pakkenberg et al., 2003). La diversité neuronale est quant à elle pour l'instant inestimable, la caractérisation de chaque sous-type neuronaux étant l'objet de débats permanents, mais pourrait atteindre 10 000 sous types de neurones distincts (Muotri and Gage, 2006). Cependant, comment et quand cette diversité neuronale est générée est encore très mal compris. L'on sait que durant la neurogénèse embryonnaire il existe une vague de prolifération et de différentiation massive des cellules progénitrices et seulement 15 à 40 % des cellules générées survivent après avoir migré vers leur territoire de destination ce qui suggère en outre l'existence de mécanismes de sélection (Ferrer et al., 1992; Finlay and Slattery, 1983). Il a été proposé, après avoir observé qu'une souris déficiente pour des mécanismes de réparation de l'ADN présente des défauts de neurogénèse, que la diversité neuronale puisse émerger de mécanismes de recombinaison de l'ADN dans les cellules somatiques au même titre que ce qui existe pour les cellules du système immunitaire (Gao et al., 1998). Des études apportent depuis des réponses parcellaires ou contradictoires et rien n'est vraiment tranché aujourd'hui. De mon point de vue, le rôle de l'environnement local dans la pression de sélection de cette diversité neuronale apparait comme une piste d'investigation prometteuse. En effet cette diversité neuronale n'est pas uniformément distribuée dans le cerveau adulte mais restreinte dans des zones spécifiques chez les mammifères, laissant supposer l'existence de « niches environnementales » favorables à cette diversité (Ninkovic and Gotz, 2007).

Dans les hépatocytes murins l'aneuploïdie est une source confirmée de diversité cellulaire (Duncan et al., 2010). Des études chez l'homme et les rongeurs ont identifié l'aneuploïdie comme caractéristique de la diversité neuronale du cerveau des mammifères (Rehen et al., 2001; Rehen et al., 2005). Jusqu'à aujourd'hui aucune analyse ne détaille précisément la

diversité des neurones du cerveau des mammifères au regard de leur aneuploïdie, hypoploïdie, hyperploïdie et recombinaison chromosomique. Aucun facteur de l'environnement local de la cellule n'a non plus été identifié comme capable de générer cette aneuploïdie dans le système nerveux central.

Nos résultats expérimentaux 1) confirment et quantifient la polyploïdie post-neurogénique aux environs de 15% dans le cortex murin, 2) quantifient une diminution de plus d'un tiers de la polyploïdie des neurones dans les embryons de souris dont la signalisation Eph :éphrine endogène est altérée. Ces travaux suggèrent donc que l'environnement local généré par l'expression des Eph:éphrines participe à la diversité neuronale adulte. Avant de confirmer mécanistiquement cette hypothèse, il faudrait au préalable réaliser une carte spatio-temporelle qui surimpose la dynamique d'expression des récepteurs Ephs et des ligands éphrines durant la neurogénèse, à la ploïdie des progéniteurs neuraux et des neurones.

De plus, nos analyses laissent envisager qu'il existe une pression de sélection différentielle sur la survie des neurones eu égard à leur ploïdie. Des données préliminaires non présentées dans ce manuscrit laissent supposer que la pression de sélection post-neurogéniques des cellules générées pourrait être différente selon la ploïdie des cellules. En effet, lors d'une analyse unique en cytomètrie de flux j'ai pu quantifier seulement 3 à 4% de neurones polyploïdes sur des cortex de nouveau-nés âgés de 4 jours (données non présentées) à comparer avec les 12 à 15% observés pour des embryons plus jeunes (P0). Ces chiffres de 3% de polyploïdie physiologique sont également retrouvés dans l'étude de Fernandino Di Cunto et ses collaborateurs pour des nouveau-nés âgés de 12 jours (Di Cunto et al., 2000). De plus, en soutien à l'hypothèse d'une mort cellulaire préférentielle des cellules hyperploïdes, il semble que ces mêmes souris, à 14,5 jours de développement in utéro présentent des pourcentages d'hyperploïdie supérieurs à ces 3% (estimation personnelle d'après les graphiques de la figure 6A de (Di Cunto et al., 2000)). Enfin les variations de ploïdies neuronales étant corrélées à des déficits mentaux chez l'homme (Rehen et al., 2005), la compréhension des mécanismes contrôlant la ploïdie neuronale me parait donc être une question d'intérêt majeur pour les neurosciences et qui pourrait apporter une lecture nouvelle des analyses traitant des fonctions cognitives.

Références Bibliographiques

Aasheim, H.C., S. Patzke, H.S. Hjorthaug, and E.F. Finne. 2005. Characterization of a novel Eph receptor tyrosine kinase, EphA10, expressed in testis. *Biochim Biophys Acta*. 1723:1-7.

Abercrombie, M. 1967. Contact inhibition: the phenomenon and its biological implications. *Natl Cancer Inst Monogr*. 26:249-77.

Adams, R.H., G.A. Wilkinson, C. Weiss, F. Diella, N.W. Gale, U. Deutsch, W. Risau, and R. Klein. 1999. Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev*. 13:295-306.

Adell, M.A., G.F. Vogel, M. Pakdel, M. Muller, H. Lindner, M.W. Hess, and D. Teis. 2014. Coordinated binding of Vps4 to ESCRT-III drives membrane neck constriction during MVB vesicle formation. *J Cell Biol*. 205:33-49.

Ahmed, Z., M.R. Douglas, M.L. Read, M. Berry, and A. Logan. 2011. Citron kinase regulates axon growth through a pathway that converges on cofilin downstream of RhoA. *Neurobiol Dis*. 41:421-9.

Ahuja, P., E. Perriard, T. Pedrazzini, S. Satoh, J.C. Perriard, and E. Ehler. 2007. Re-expression of proteins involved in cytokinesis during cardiac hypertrophy. *Exp Cell Res*. 313:1270-83.

Altan-Bonnet, N., R.D. Phair, R.S. Polishchuk, R. Weigert, and J. Lippincott-Schwartz. 2003. A role for Arf1 in mitotic Golgi disassembly, chromosome segregation, and cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:13314-9.

Anastas, S.B., D. Mueller, S.L. Semple-Rowland, J.J. Breunig, and M.R. Sarkisian. 2011. Failed cytokinesis of neural progenitors in citron kinase-deficient rats leads to multiciliated neurons. *Cereb Cortex*. 21:338-44.

Aoki, M., T. Yamashita, and M. Tohyama. 2004. EphA receptors direct the differentiation of mammalian neural precursor cells through a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Biol Chem*. 279:32643-50.

Arvanitis, D.N., A. Behar, A. Drougard, P. Roullet, and A. Davy. 2014. Cortical abnormalities and non-spatial learning deficits in a mouse model of CranioFrontoNasal syndrome. *PLoS One*. 9:e88325.

Arvanitis, D.N., A. Behar, P. Tryoen-Toth, J.O. Bush, T. Jungas, N. Vitale, and A. Davy. 2013. Ephrin B1 maintains apical adhesion of neural progenitors. *Development*. 140:2082-92.

Ashton, R.S., A. Conway, C. Pangarkar, J. Bergen, K.I. Lim, P. Shah, M. Bissell, and D.V. Schaffer. 2012. Astrocytes regulate adult hippocampal neurogenesis through ephrin-B signaling. *Nat Neurosci*. 15:1399-406.

Balasubramanian, M.K., E. Bi, and M. Glotzer. 2004. Comparative analysis of cytokinesis in budding yeast, fission yeast and animal cells. *Curr Biol*. 14:R806-18.

Ballif, B.A., G.R. Carey, S.R. Sunyaev, and S.P. Gygi. 2008. Large-scale identification and evolution indexing of tyrosine phosphorylation sites from murine brain. *J Proteome Res*. 7:311-8.

Bassi, Z.I., M. Audusseau, M.G. Riparbelli, G. Callaini, and P.P. D'Avino. 2013. Citron kinase controls a molecular network required for midbody formation in cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:9782-7.

Bassi, Z.I., K.J. Verbrugghe, L. Capalbo, S. Gregory, E. Montembault, D.M. Glover, and P.P. D'Avino. 2011. Sticky/Citron kinase maintains proper RhoA localization at the cleavage site during cytokinesis. *J Cell Biol*. 195:595-603.

Batlle, E., J. Bacani, H. Begthel, S. Jonkheer, A. Gregorieff, M. van de Born, N. Malats, E. Sancho, E. Boon, T. Pawson, S. Gallinger, S. Pals, and H. Clevers. 2005. EphB receptor activity suppresses colorectal cancer progression. *Nature*. 435:1126-30.

Batlle, E., J.T. Henderson, H. Beghtel, M.M. van den Born, E. Sancho, G. Huls, J. Meeldijk, J. Robertson, M. van de Wetering, T. Pawson, and H. Clevers. 2002. Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell*. 111:251-63.

Batlle, E., and D.G. Wilkinson. 2012. Molecular mechanisms of cell segregation and boundary formation in development and tumorigenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 4:a008227.

Ben-Ze'ev, A., and A. Raz. 1981. Multinucleation and inhibition of cytokinesis in suspended cells: reversal upon reattachment to a substrate. *Cell*. 26:107-15.

Bendix, P.M., G.H. Koenderink, D. Cuvelier, Z. Dogic, B.N. Koeleman, W.M. Brieher, C.M. Field, L. Mahadevan, and D.A. Weitz. 2008. A quantitative analysis of contractility in active cytoskeletal protein networks. *Biophys J*. 94:3126-36.

Bhutta, M.S., C.J. McInerny, and G.W. Gould. 2014. ESCRT function in cytokinesis: location, dynamics and regulation by mitotic kinases. *Int J Mol Sci*. 15:21723-39.

Bianconi, E., A. Piovesan, F. Facchin, A. Beraudi, R. Casadei, F. Frabetti, L. Vitale, M.C. Pelleri, S. Tassani, F. Piva, S. Perez-Amodio, P. Strippoli, and S. Canaider. 2013. An estimation of the number of cells in the human body. *Ann Hum Biol*. 40:463-71.

Binda, E., A. Visioli, F. Giani, G. Lamorte, M. Copetti, K.L. Pitter, J.T. Huse, L. Cajola, N. Zanetti, F. DiMeco, L. De Filippis, A. Mangiola, G. Maira, C. Anile, P. De Bonis, B.A. Reynolds, E.B. Pasquale, and A.L. Vescovi. 2012. The EphA2 receptor drives self-renewal and tumorigenicity in stem-like tumor-propagating cells from human glioblastomas. *Cancer Cell*. 22:765-80.

Binns, K.L., P.P. Taylor, F. Sicheri, T. Pawson, and S.J. Holland. 2000. Phosphorylation of tyrosine residues in the kinase domain and juxtamembrane region regulates the biological and catalytic activities of Eph receptors. *Mol Cell Biol*. 20:4791-805.

Bishop, J.D., and J.M. Schumacher. 2002. Phosphorylation of the carboxyl terminus of inner centromere protein (INCENP) by the Aurora B Kinase stimulates Aurora B kinase activity. *J Biol Chem*. 277:27577-80.

Bjorklund, M., M. Taipale, M. Varjosalo, J. Saharinen, J. Lahdenpera, and J. Taipale. 2006. Identification of pathways regulating cell size and cell-cycle progression by RNAi. *Nature*. 439:1009-13.

Bleck, M., M.S. Itano, D.S. Johnson, V.K. Thomas, A.J. North, P.D. Bieniasz, and S.M. Simon. 2014. Temporal and spatial organization of ESCRT protein recruitment during HIV-1 budding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111:12211-6.

Bluemink, J.G., and S.W. de Laat. 1973. New membrane formation during cytokinesis in normal and cytochalasin B-treated eggs of Xenopus laevis. I. Electron microscope observations. *J Cell Biol*. 59:89-108.

Boassa, D., J.L. Solan, A. Papas, P. Thornton, P.D. Lampe, and G.E. Sosinsky. 2010. Trafficking and recycling of the connexin43 gap junction protein during mitosis. *Traffic*. 11:1471-86.

Boissier, P., J. Chen, and U. Huynh-Do. 2013. EphA2 signaling following endocytosis: role of Tiam1. *Traffic*. 14:1255-71.

Bong, Y.S., H.S. Lee, L. Carim-Todd, K. Mood, T.G. Nishanian, L. Tessarollo, and I.O. Daar. 2007. ephrinB1 signals from the cell surface to the nucleus by recruitment of STAT3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:17305-10.

Bong, Y.S., Y.H. Park, H.S. Lee, K. Mood, A. Ishimura, and I.O. Daar. 2004. Tyr-298 in ephrinB1 is critical for an interaction with the Grb4 adaptor protein. *Biochem J*. 377:499-507.

Bossing, T., and A.H. Brand. 2002. Dephrin, a transmembrane ephrin with a unique structure, prevents interneuronal axons from exiting the Drosophila embryonic CNS. *Development*. 129:4205-18.

Bottcher, R.T., S. Wiesner, A. Braun, R. Wimmer, A. Berna, N. Elad, O. Medalia, A. Pfeifer, A. Aszodi, M. Costell, and R. Fassler. 2009. Profilin 1 is required for abscission during late cytokinesis of chondrocytes. *Embo J*. 28:1157-69.

Bouzioukh, F., G.A. Wilkinson, G. Adelmann, M. Frotscher, V. Stein, and R. Klein. 2007. Tyrosine phosphorylation sites in ephrinB2 are required for hippocampal long-term potentiation but not long-term depression. *J Neurosci*. 27:11279-88.

Boyle, M., A. Nighorn, and J.B. Thomas. 2006. Drosophila Eph receptor guides specific axon branches of mushroom body neurons. *Development*. 133:1845-54.

Brantley-Sieders, D.M. 2012. Clinical relevance of Ephs and ephrins in cancer: lessons from breast, colorectal, and lung cancer profiling. *Semin Cell Dev Biol*. 23:102-8.

Brantley-Sieders, D.M., G. Zhuang, D. Hicks, W.B. Fang, Y. Hwang, J.M. Cates, K. Coffman, D. Jackson, E. Bruckheimer, R.S. Muraoka-Cook, and J. Chen. 2008. The receptor tyrosine kinase EphA2 promotes mammary adenocarcinoma tumorigenesis and metastatic progression in mice by amplifying ErbB2 signaling. *J Clin Invest*. 118:64-78.

Braun, R.E., R.R. Behringer, J.J. Peschon, R.L. Brinster, and R.D. Palmiter. 1989. Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid. *Nature*. 337:373-6.

Bringmann, H., and A.A. Hyman. 2005. A cytokinesis furrow is positioned by two consecutive signals. *Nature*. 436:731-4.

Bringmann, H., G. Skiniotis, A. Spilker, S. Kandels-Lewis, I. Vernos, and T. Surrey. 2004. A kinesin-like motor inhibits microtubule dynamic instability. *Science*. 303:1519-22.

Brodsky, V., A.L. Chernyaev, and I.A. Vasilyeva. 1991. Variability of the cardiomyocyte ploidy in normal human hearts. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 61:289-94.

Bruckner, K., E.B. Pasquale, and R. Klein. 1997. Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors. *Science*. 275:1640-3.

Buck, R.C., and J.M. Tisdale. 1962. The fine structure of the mid-body of the rat erythroblast. *J Cell Biol*. 13:109-15.

Burton, K., and D.L. Taylor. 1997. Traction forces of cytokinesis measured with optically modified elastic substrata. *Nature*. 385:450-4.

Bush, J.O., and P. Soriano. 2010. Ephrin-B1 forward signaling regulates craniofacial morphogenesis by controlling cell proliferation across Eph-ephrin boundaries. *Genes Dev*. 24:2068-80.

Cadart, C., E. Zlotek-Zlotkiewicz, M. Le Berre, M. Piel, and H.K. Matthews. 2014. Exploring the function of cell shape and size during mitosis. *Dev Cell*. 29:159-69.

Camera, P., J.S. da Silva, G. Griffiths, M.G. Giuffrida, L. Ferrara, V. Schubert, S. Imarisio, L. Silengo, C.G. Dotti, and F. Di Cunto. 2003. Citron-N is a neuronal Rho-associated protein involved in Golgi organization through actin cytoskeleton regulation. *Nat Cell Biol*. 5:1071-8.

Camera, P., V. Schubert, M. Pellegrino, G. Berto, A. Vercelli, P. Muzzi, E. Hirsch, F. Altruda, C.G. Dotti, and F. Di Cunto. 2008. The RhoA-associated protein Citron-N controls dendritic spine maintenance by interacting with spine-associated Golgi compartments. *EMBO Rep*. 9:384-92.

Campisi, J., and F. d'Adda di Fagagna. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:729-40.
Canman, J.C., L. Lewellyn, K. Laband, S.J. Smerdon, A. Desai, B. Bowerman, and K. Oegema. 2008. Inhibition of Rac by the GAP activity of centralspindlin is essential for cytokinesis. *Science*. 322:1543-6.
Capalbo, L., E. Montembault, T. Takeda, Z.I. Bassi, D.M. Glover, and P.P. D'Avino. 2012. The chromosomal passenger complex controls the function of endosomal sorting complex required for transport-III Snf7 proteins during cytokinesis. *Open Biol*. 2:120070.
Capaldo, C.T., S. Koch, M. Kwon, O. Laur, C.A. Parkos, and A. Nusrat. 2011. Tight function zonula occludens-3 regulates cyclin D1-dependent cell proliferation. *Mol Biol Cell*. 22:1677-85.
Carlton, J.G., and J. Martin-Serrano. 2007. Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science*. 316:1908-12.
Carmena, M., M.G. Riparbelli, G. Minestrini, A.M. Tavares, R. Adams, G. Callaini, and D.M. Glover. 1998. Drosophila polo kinase is required for cytokinesis. *J Cell Biol*. 143:659-71.
Carreno, S., I. Kouranti, E.S. Glusman, M.T. Fuller, A. Echard, and F. Payre. 2008. Moesin and its activating kinase Slik are required for cortical stability and microtubule organization in mitotic cells. *J Cell Biol*. 180:739-46.
Carter, S.B. 1967. Effects of cytochalasins on mammalian cells. *Nature*. 213:261-4.
Carter, S.B. 1968. Tissue homeostasis and the biological basis of cancer. *Nature*. 220:970-4.
Carvalho, R.F., M. Beutler, K.J. Marler, B. Knoll, E. Becker-Barroso, R. Heintzmann, T. Ng, and U. Drescher. 2006. Silencing of EphA3 through a cis interaction with ephrinA5. *Nat Neurosci*. 9:322-30.
Castedo, M., A. Coquelle, S. Vivet, I. Vitale, A. Kauffmann, P. Dessen, M.O. Pequignot, N. Casares, A. Valent, S. Mouhamad, E. Schmitt, N. Modjtahedi, W. Vainchenker, L. Zitvogel, V. Lazar, C. Garrido, and G. Kroemer. 2006. Apoptosis regulation in tetraploid cancer cells. *Embo J*. 25:2584-95.
Cauvin, C., and A. Echard. 2014. Phosphoinositides: Lipids with informative heads and mastermind functions in cell division. *Biochim Biophys Acta*.
Cavey, M., and T. Lecuit. 2009. Molecular bases of cell-cell junctions stability and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1:a002998.
Celton-Morizur, S., G. Merlen, D. Couton, G. Margall-Ducos, and C. Desdouets. 2009. The insulin/Akt pathway controls a specific cell division program that leads to generation of binucleated tetraploid liver cells in rodents. *J Clin Invest*. 119:1880-7.
Chan, C.S., and D. Botstein. 1993. Isolation and characterization of chromosome-gain and increase-in-ploidy mutants in yeast. *Genetics*. 135:677-91.
Chang, Y., O. Klezovitch, R.S. Walikonis, V. Vasioukhin, and J.J. LoTurco. 2010. Discs large 5 is required for polarization of citron kinase in mitotic neural precursors. *Cell Cycle*. 9:1990-7.
Chen, P., N. Rossi, S. Priddy, C.R. Pierson, A.W. Studebaker, and R.A. Johnson. 2015. EphB2 activation is required for ependymoma development as well as inhibits differentiation and promotes proliferation of the transformed cell. *Sci Rep*. 5:9248.
Chen, S., and D.D. Tang. 2014. c-Abl tyrosine kinase regulates cytokinesis of human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 50:1076-83.
Chenaux, G., and M. Henkemeyer. 2011. Forward signaling by EphB1/EphB2 interacting with ephrin-B ligands at the optic chiasm is required to form the ipsilateral projection. *Eur J Neurosci*. 34:1620-33.

Choi, S., and S. Park. 1999. Phosphorylation at Tyr-838 in the kinase domain of EphA8 modulates Fyn binding to the Tyr-615 site by enhancing tyrosine kinase activity. *Oncogene*. 18:5413-22.

Chow, K.K., S. Naik, S. Kakarla, V.S. Brawley, D.R. Shaffer, Z. Yi, N. Rainusso, M.F. Wu, H. Liu, Y. Kew, R.G. Grossman, S. Powell, D. Lee, N. Ahmed, and S. Gottschalk. 2013. T cells redirected to EphA2 for the immunotherapy of glioblastoma. *Mol Ther*. 21:629-37.

Chukkapalli, S., M. Amessou, A.K. Dilly, H. Dekhil, J. Zhao, Q. Liu, A. Bejna, R.D. Thomas, S. Bandyopadhyay, T.A. Bismar, D. Neill, L. Azoulay, G. Batist, and M. Kandouz. 2014. Role of the EphB2 receptor in autophagy, apoptosis and invasion in human breast cancer cells. *Exp Cell Res*. 320:233-46.

Chumley, M.J., T. Catchpole, R.E. Silvany, S.G. Kernie, and M. Henkemeyer. 2007. EphB receptors regulate stem/progenitor cell proliferation, migration, and polarity during hippocampal neurogenesis. *J Neurosci*. 27:13481-90.

Cimini, D., B. Howell, P. Maddox, A. Khodjakov, F. Degrassi, and E.D. Salmon. 2001. Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells. *J Cell Biol*. 153:517-27.

Clifford, M.A., W. Athar, C.E. Leonard, A. Russo, P.J. Sampognaro, M.S. Van der Goes, D.A. Burton, X. Zhao, R.R. Lalchandani, M. Sahin, S. Vicini, and M.J. Donoghue. 2014. EphA7 signaling guides cortical dendritic development and spine maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111:4994-9.

Clijsters, L., W. van Zon, B.T. Riet, E. Voets, M. Boekhout, J. Ogink, C. Rumpf-Kienzl, and R.M. Wolthuis. 2014. Inefficient degradation of cyclin B1 re-activates the spindle checkpoint right after sister chromatid disjunction. *Cell Cycle*. 13:2370-8.

Coller, H.A., L. Sang, and J.M. Roberts. 2006. A new description of cellular quiescence. *PLoS Biol*. 4:e83.

Collins, K., and J.R. Mitchell. 2002. Telomerase in the human organism. *Oncogene*. 21:564-79.

Comabella, M., D.W. Craig, C. Morcillo-Suarez, J. Rio, A. Navarro, M. Fernandez, R. Martin, and X. Montalban. 2009. Genome-wide scan of 500,000 single-nucleotide polymorphisms among responders and nonresponders to interferon beta therapy in multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 66:972-8.

comittee, E.N. 1997. Unified nomenclature for Eph family receptors and their ligands, the ephrins. Eph Nomenclature Committee. *Cell*. 90:403-4.

Conover, J.C., F. Doetsch, J.M. Garcia-Verdugo, N.W. Gale, G.D. Yancopoulos, and A. Alvarez-Buylla. 2000. Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nat Neurosci*. 3:1091-7.

Contractor, A., C. Rogers, C. Maron, M. Henkemeyer, G.T. Swanson, and S.F. Heinemann. 2002. Trans-synaptic Eph receptor-ephrin signaling in hippocampal mossy fiber LTP. *Science*. 296:1864-9.

Cooke, J.E., H.A. Kemp, and C.B. Moens. 2005. EphA4 is required for cell adhesion and rhombomere-boundary formation in the zebrafish. *Curr Biol*. 15:536-42.

Cowan, C.A., and M. Henkemeyer. 2001. The SH2/SH3 adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals. *Nature*. 413:174-9.

Cowan, C.W., Y.R. Shao, M. Sahin, S.M. Shamah, M.Z. Lin, P.L. Greer, S. Gao, E.C. Griffith, J.S. Brugge, and M.E. Greenberg. 2005. Vav family GEFs link activated Ephs to endocytosis and axon guidance. *Neuron*. 46:205-17.

Crowell, E.F., A.L. Gaffuri, B. Gayraud-Morel, S. Tajbakhsh, and A. Echard. 2014. Engulfment of the midbody remnant after cytokinesis in mammalian cells. *J Cell Sci*. 127:3840-51.

Crowell, E.F., J.Y. Tinevez, and A. Echard. 2013. A simple model for the fate of the cytokinesis midbody remnant: implications for remnant degradation by autophagy: modeling remnant production and degradation enables re-interpretation of published data and improves design of future experiments. *Bioessays*. 35:472-81.

Cunto, F.D., S. Imarisio, P. Camera, C. Boitani, F. Altruda, and L. Silengo. 2002. Essential role of citron kinase in cytokinesis of spermatogenic precursors. *J Cell Sci*. 115:4819-26.

D'Avino, P.P., M.S. Savoian, and D.M. Glover. 2004. Mutations in sticky lead to defective organization of the contractile ring during cytokinesis and are enhanced by Rho and suppressed by Rac. *J Cell Biol*. 166:61-71.

Dambournet, D., M. Machicoane, L. Chesneau, M. Sachse, M. Rocancourt, A. El Marjou, E. Formstecher, R. Salomon, B. Goud, and A. Echard. 2011. Rab35 GTPase and OCRL phosphatase remodel lipids and F-actin for successful cytokinesis. *Nat Cell Biol*. 13:981-8.

Davies, B.A., A.P. Norgan, J.A. Payne, M.E. Schulz, M.D. Nichols, J.A. Tan, Z. Xu, and D.J. Katzmann. 2014. Vps4 stimulatory element of the cofactor Vta1 contacts the ATPase Vps4 alpha7 and alpha9 to stimulate ATP hydrolysis. *J Biol Chem*. 289:28707-18.

Davis, S., N.W. Gale, T.H. Aldrich, P.C. Maisonpierre, V. Lhotak, T. Pawson, M. Goldfarb, and G.D. Yancopoulos. 1994. Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity. *Science*. 266:816-9.

Davis, T.L., J.R. Walker, P. Loppnau, C. Butler-Cole, A. Allali-Hassani, and S. Dhe-Paganon. 2008. Autoregulation by the juxtamembrane region of the human ephrin receptor tyrosine kinase A3 (EphA3). *Structure*. 16:873-84.

Davoli, T., and T. de Lange. 2011. The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 27:585-610.

Davoli, T., and T. de Lange. 2012. Telomere-driven tetraploidization occurs in human cells undergoing crisis and promotes transformation of mouse cells. *Cancer Cell*. 21:765-76.

Davy, A., J. Aubin, and P. Soriano. 2004. Ephrin-B1 forward and reverse signaling are required during mouse development. *Genes Dev*. 18:572-83.

Davy, A., J.O. Bush, and P. Soriano. 2006. Inhibition of gap junction communication at ectopic Eph/ephrin boundaries underlies craniofrontonasal syndrome. *PLoS Biol*. 4:e315.

Davy, A., N.W. Gale, E.W. Murray, R.A. Klinghoffer, P. Soriano, C. Feuerstein, and S.M. Robbins. 1999. Compartmentalized signaling by GPI-anchored ephrin-A5 requires the Fyn tyrosine kinase to regulate cellular adhesion. *Genes Dev*. 13:3125-35.

Davy, A., and P. Soriano. 2007. Ephrin-B2 forward signaling regulates somite patterning and neural crest cell development. *Dev Biol*. 304:182-93.

Day, B.W., B.W. Stringer, F. Al-Ejeh, M.J. Ting, J. Wilson, K.S. Ensbey, P.R. Jamieson, Z.C. Bruce, Y.C. Lim, C. Offenhauser, S. Charmsaz, L.T. Cooper, J.K. Ellacott, A. Harding, L. Leveque, P. Inglis, S. Allan, D.G. Walker, M. Lackmann, G. Osborne, K.K. Khanna, B.A. Reynolds, J.D. Lickliter, and A.W. Boyd. 2013. EphA3 maintains tumorigenicity and is a therapeutic target in glioblastoma multiforme. *Cancer Cell*. 23:238-48.

Day, B.W., B.W. Stringer, and A.W. Boyd. 2014. Eph receptors as therapeutic targets in glioblastoma. *Br J Cancer*. 111:1255-61.

Dean, S.O., and J.A. Spudich. 2006. Rho kinase's role in myosin recruitment to the equatorial cortex of mitotic Drosophila S2 cells is for myosin regulatory light chain phosphorylation. *PLoS One*. 1:e131.

Dechant, R., and M. Glotzer. 2003. Centrosome separation and central spindle assembly act in redundant pathways that regulate microtubule density and trigger cleavage furrow formation. *Dev Cell*. 4:333-44.

Depaepe, V., N. Suarez-Gonzalez, A. Dufour, L. Passante, J.A. Gorski, K.R. Jones, C. Ledent, and P. Vanderhaeghen. 2005. Ephrin signalling controls brain size by regulating apoptosis of neural progenitors. *Nature*. 435:1244-50.

Dewhurst, S.M., N. McGranahan, R.A. Burrell, A.J. Rowan, E. Gronroos, D. Endesfelder, T. Joshi, D. Mouradov, P. Gibbs, R.L. Ward, N.J. Hawkins, Z. Szallasi, O.M. Sieber, and C. Swanton. 2014. Tolerance of whole-genome doubling propagates chromosomal instability and accelerates cancer genome evolution. *Cancer Discov*. 4:175-85.

Di Cunto, F., E. Calautti, J. Hsiao, L. Ong, G. Topley, E. Turco, and G.P. Dotto. 1998. Citron rho-interacting kinase, a novel tissue-specific ser/thr kinase encompassing the Rho-Rac-binding protein Citron. *J Biol Chem*. 273:29706-11.

Di Cunto, F., S. Imarisio, E. Hirsch, V. Broccoli, A. Bulfone, A. Migheli, C. Atzori, E. Turco, R. Triolo, G.P. Dotto, L. Silengo, and F. Altruda. 2000. Defective neurogenesis in citron kinase knockout mice by altered cytokinesis and massive apoptosis. *Neuron*. 28:115-27.

Diehl, S., R. Bruno, G.A. Wilkinson, D.A. Loose, J. Wilting, L. Schweigerer, and R. Klein. 2005. Altered expression patterns of EphrinB2 and EphB2 in human umbilical vessels and congenital venous malformations. *Pediatr Res*. 57:537-44.

Ding, J., L. Su, and G. Gao. 2011. Hrs inhibits citron kinase-mediated HIV-1 budding via its FYVE domain. *Protein Cell*. 2:470-6.

Dobrzanski, P., K. Hunter, S. Jones-Bolin, H. Chang, C. Robinson, S. Pritchard, H. Zhao, and B. Ruggeri. 2004. Antiangiogenic and antitumor efficacy of EphA2 receptor antagonist. *Cancer Res*. 64:910-9.

Douglas, M.E., T. Davies, N. Joseph, and M. Mishima. 2010. Aurora B and 14-3-3 coordinately regulate clustering of centralspindlin during cytokinesis. *Curr Biol*. 20:927-33.

Dravis, C., and M. Henkemeyer. 2011. Ephrin-B reverse signaling controls septation events at the embryonic midline through separate tyrosine phosphorylation-independent signaling avenues. *Dev Biol*. 355:138-51.

Dubreuil, V., A.M. Marzesco, D. Corbeil, W.B. Huttner, and M. Wilsch-Brauninger. 2007. Midbody and primary cilium of neural progenitors release extracellular membrane particles enriched in the stem cell marker prominin-1. *J Cell Biol*. 176:483-95.

Duncan, A.W., M.H. Taylor, R.D. Hickey, A.E. Hanlon Newell, M.L. Lenzi, S.B. Olson, M.J. Finegold, and M. Grompe. 2010. The ploidy conveyor of mature hepatocytes as a source of genetic variation. *Nature*. 467:707-10.

Dym, M., and D.W. Fawcett. 1971. Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. *Biol Reprod*. 4:195-215.

Echard, A. 2008. Membrane traffic and polarization of lipid domains during cytokinesis. *Biochem Soc Trans*. 36:395-9.

Echard, A. 2012. Connecting membrane traffic to ESCRT and the final cut. *Nat Cell Biol*. 14:983-5.

Echard, A., G.R. Hickson, E. Foley, and P.H. O'Farrell. 2004. Terminal cytokinesis events uncovered after an RNAi screen. *Curr Biol*. 14:1685-93.

Eikenes, A.H., A. Brech, H. Stenmark, and K. Haglund. 2013. Spatiotemporal control of Cindr at ring canals during incomplete cytokinesis in the Drosophila male germline. *Dev Biol*. 377:9-20.

Eisenhoffer, G.T., and J. Rosenblatt. 2013. Bringing balance by force: live cell extrusion controls epithelial cell numbers. *Trends Cell Biol*. 23:185-92.

El Amine, N., A. Kechad, S. Jananji, and G.R. Hickson. 2013. Opposing actions of septins and Sticky on Anillin promote the transition from contractile to midbody ring. *J Cell Biol*. 203:487-504.

Elad, N., S. Abramovitch, H. Sabanay, and O. Medalia. 2011. Microtubule organization in the final stages of cytokinesis as revealed by cryo-electron tomography. *J Cell Sci*. 124:207-15.

Elia, N., G. Fabrikant, M.M. Kozlov, and J. Lippincott-Schwartz. 2012. Computational model of cytokinetic abscission driven by ESCRT-III polymerization and remodeling. *Biophys J*. 102:2309-20.

Elia, N., R. Sougrat, T.A. Spurlin, J.H. Hurley, and J. Lippincott-Schwartz. 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*. 108:4846-51.

Emoto, K., H. Inadome, Y. Kanaho, S. Narumiya, and M. Umeda. 2005. Local change in phospholipid composition at the cleavage furrow is essential for completion of cytokinesis. *J Biol Chem*. 280:37901-7.

Emoto, K., T. Kobayashi, A. Yamaji, H. Aizawa, I. Yahara, K. Inoue, and M. Umeda. 1996. Redistribution of phosphatidylethanolamine at the cleavage furrow of dividing cells during cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:12867-72.

Engel, F.B., M. Schebesta, and M.T. Keating. 2006. Anillin localization defect in cardiomyocyte binucleation. *J Mol Cell Cardiol*. 41:601-12.

Eriksson, O., M. Ramstrom, K. Hornaeus, J. Bergquist, D. Mokhtari, and A. Siegbahn. 2014. The Eph tyrosine kinase receptors EphB2 and EphA2 are novel proteolytic substrates of tissue factor/coagulation factor VIIa. *J Biol Chem*. 289:32379-91.

Ethell, I.M., and D.W. Ethell. 2007. Matrix metalloproteinases in brain development and remodeling: synaptic functions and targets. *J Neurosci Res*. 85:2813-23.

Ettinger, A.W., M. Wilsch-Brauninger, A.M. Marzesco, M. Bickle, A. Lohmann, Z. Maliga, J. Karbanova, D. Corbeil, A.A. Hyman, and W.B. Huttner. 2011. Proliferating versus differentiating stem and cancer cells exhibit distinct midbody-release behaviour. *Nat Commun*. 2:503.

Fabbro, M., B.B. Zhou, M. Takahashi, B. Sarcevic, P. Lal, M.E. Graham, B.G. Gabrielli, P.J. Robinson, E.A. Nigg, Y. Ono, and K.K. Khanna. 2005. Cdk1/Erk2- and Plk1-dependent phosphorylation of a centrosome protein, Cep55, is required for its recruitment to midbody and cytokinesis. *Dev Cell*. 9:477-88.

Falivelli, G., E.M. Lisabeth, E. Rubio de la Torre, G. Perez-Tenorio, G. Tosato, O. Salvucci, and E.B. Pasquale. 2013. Attenuation of eph receptor kinase activation in cancer cells by coexpressed ephrin ligands. *PLoS One*. 8:e81445.

Falnikar, A., S. Tole, M. Liu, J.S. Liu, and P.W. Baas. 2013. Polarity in migrating neurons is related to a mechanism analogous to cytokinesis. *Curr Biol*. 23:1215-20.

Faoro, L., P.A. Singleton, G.M. Cervantes, F.E. Lennon, N.W. Choong, R. Kanteti, B.D. Ferguson, A.N. Husain, M.S. Tretiakova, N. Ramnath, E.E. Vokes, and R. Salgia. 2010. EphA2 mutation in lung squamous cell carcinoma promotes increased cell survival, cell invasion, focal adhesions, and mammalian target of rapamycin activation. *J Biol Chem*. 285:18575-85.

Fawcett, D.W., S. Ito, and D. Slautterback. 1959. The occurrence of intercellular bridges in groups of cells exhibiting synchronous differentiation. *J Biophys Biochem Cytol*. 5:453-60.

Feng, H., B. Hu, M.J. Jarzynka, Y. Li, S. Keezer, T.G. Johns, C.K. Tang, R.L. Hamilton, K. Vuori, R. Nishikawa, J.N. Sarkaria, T. Fenton, T. Cheng, F.B. Furnari, W.K. Cavenee,

and S.Y. Cheng. 2012. Phosphorylation of dedicator of cytokinesis 1 (Dock180) at tyrosine residue Y722 by Src family kinases mediates EGFRvIII-driven glioblastoma tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109:3018-23.

Ferluga, S., R. Hantgan, Y. Goldgur, J.P. Himanen, D.B. Nikolov, and W. Debinski. 2013. Biological and structural characterization of glycosylation on ephrin-A1, a preferred ligand for EphA2 receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem*. 288:18448-57.

Ferrer, I., E. Soriano, J.A. del Rio, S. Alcantara, and C. Auladell. 1992. Cell death and removal in the cerebral cortex during development. *Prog Neurobiol*. 39:1-43.

Field, S.J., N. Madson, M.L. Kerr, K.A. Galbraith, C.E. Kennedy, M. Tahiliani, A. Wilkins, and L.C. Cantley. 2005. PtdIns(4,5)P2 functions at the cleavage furrow during cytokinesis. *Curr Biol*. 15:1407-12.

Fielding, A.B., E. Schonteich, J. Matheson, G. Wilson, X. Yu, G.R. Hickson, S. Srivastava, S.A. Baldwin, R. Prekeris, and G.W. Gould. 2005. Rab11-FIP3 and FIP4 interact with Arf6 and the exocyst to control membrane traffic in cytokinesis. *Embo J*. 24:3389-99.

Fietz, S.A., and W.B. Huttner. 2011. Cortical progenitor expansion, self-renewal and neurogenesis-a polarized perspective. *Curr Opin Neurobiol*. 21:23-35.

Finer, J.T., R.M. Simmons, and J.A. Spudich. 1994. Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature*. 368:113-9.

Finlay, B.L., and M. Slattery. 1983. Local differences in the amount of early cell death in neocortex predict adult local specializations. *Science*. 219:1349-51.

Fischer-Friedrich, E., A.A. Hyman, F. Julicher, D.J. Muller, and J. Helenius. 2014. Quantification of surface tension and internal pressure generated by single mitotic cells. *Sci Rep*. 4:6213.

Flemming, W. 1965. Contributions To The Knowledge Of The Cell And Its Vital Processes. *J Cell Biol*. 25:3-69.

Florek, M., M. Haase, A.M. Marzesco, D. Freund, G. Ehninger, W.B. Huttner, and D. Corbeil. 2005. Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer. *Cell Tissue Res*. 319:15-26.

Foe, V.E., and G. von Dassow. 2008. Stable and dynamic microtubules coordinately shape the myosin activation zone during cytokinetic furrow formation. *J Cell Biol*. 183:457-70.

Forsyth, N.R., W.E. Wright, and J.W. Shay. 2002. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation*. 69:188-97.

Founounou, N., N. Loyer, and R. Le Borgne. 2013. Septins regulate the contractility of the actomyosin ring to enable adherens junction remodeling during cytokinesis of epithelial cells. *Dev Cell*. 24:242-55.

Fox, B.P., and R.P. Kandpal. 2011. A paradigm shift in EPH receptor interaction: biological relevance of EPHB6 interaction with EPHA2 and EPHB2 in breast carcinoma cell lines. *Cancer Genomics Proteomics*. 8:185-93.

Frade, J.M. 2010. Somatic tetraploidy in vertebrate neurons: Implications in physiology and pathology. *Commun Integr Biol*. 3:201-3.

Frantz, C., K.M. Stewart, and V.M. Weaver. 2010. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*. 123:4195-200.

Freiss, G., G. Bompard, and F. Vignon. 2004. [PTPL1, a proapoptotic protein tyrosine phosphatase in breast cancers]. *Bull Cancer*. 91:325-32.

Frenette, P., E. Haines, M. Loloyan, M. Kinal, P. Pakarian, and A. Piekny. 2012. An anillin-Ect2 complex stabilizes central spindle microtubules at the cortex during cytokinesis. *PLoS One*. 7:e34888.

Fu, Y., J. Huang, K.S. Wang, X. Zhang, and Z.G. Han. 2011. RNA interference targeting CITRON can significantly inhibit the proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *Mol Biol Rep*. 38:693-702.

Fujiwara, T., M. Bandi, M. Nitta, E.V. Ivanova, R.T. Bronson, and D. Pellman. 2005. Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature*. 437:1043-7.

Furuyashiki, T., K. Fujisawa, A. Fujita, P. Madaule, S. Uchino, M. Mishina, H. Bito, and S. Narumiya. 1999. Citron, a Rho-target, interacts with PSD-95/SAP-90 at glutamatergic synapses in the thalamus. *J Neurosci*. 19:109-18.

Gai, M., P. Camera, A. Dema, F. Bianchi, G. Berto, E. Scarpa, G. Germena, and F. Di Cunto. 2011. Citron kinase controls abscission through RhoA and anillin. *Mol Biol Cell*. 22:3768-78.

Gaietta, G.M., B.N. Giepmans, T.J. Deerinck, W.B. Smith, L. Ngan, J. Llopis, S.R. Adams, R.Y. Tsien, and M.H. Ellisman. 2006. Golgi twins in late mitosis revealed by genetically encoded tags for live cell imaging and correlated electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:17777-82.

Gallardo, M.H., J.W. Bickham, R.L. Honeycutt, R.A. Ojeda, and N. Kohler. 1999. Discovery of tetraploidy in a mammal. *Nature*. 401:341.

Ganem, N.J., H. Cornils, S.Y. Chiu, K.P. O'Rourke, J. Arnaud, D. Yimlamai, M. Thery, F.D. Camargo, and D. Pellman. 2014. Cytokinesis failure triggers hippo tumor suppressor pathway activation. *Cell*. 158:833-48.

Gao, Q., W. Liu, J. Cai, M. Li, Y. Gao, W. Lin, and Z. Li. 2014. EphB2 promotes cervical cancer progression by inducing epithelial-mesenchymal transition. *Hum Pathol*. 45:372-81.

Gao, Y., Y. Sun, K.M. Frank, P. Dikkes, Y. Fujiwara, K.J. Seidl, J.M. Sekiguchi, G.A. Rathbun, W. Swat, J. Wang, R.T. Bronson, B.A. Malynn, M. Bryans, C. Zhu, J. Chaudhuri, L. Davidson, R. Ferrini, T. Stamato, S.H. Orkin, M.E. Greenberg, and F.W. Alt. 1998. A critical role for DNA end-joining proteins in both lymphogenesis and neurogenesis. *Cell*. 95:891-902.

Genander, M., M.M. Halford, N.J. Xu, M. Eriksson, Z. Yu, Z. Qiu, A. Martling, G. Greicius, S. Thakar, T. Catchpole, M.J. Chumley, S. Zdunek, C. Wang, T. Holm, S.P. Goff, S. Pettersson, R.G. Pestell, M. Henkemeyer, and J. Frisen. 2009. Dissociation of EphB2 signaling pathways mediating progenitor cell proliferation and tumor suppression. *Cell*. 139:679-92.

Georgakopoulos, A., C. Litterst, E. Ghersi, L. Baki, C. Xu, G. Serban, and N.K. Robakis. 2006. Metalloproteinase/Presenilin1 processing of ephrinB regulates EphB-induced Src phosphorylation and signaling. *Embo J*. 25:1242-52.

Georgakopoulos, A., J. Xu, C. Xu, G. Mauger, G. Barthet, and N.K. Robakis. 2011. Presenilin1/gamma-secretase promotes the EphB2-induced phosphorylation of ephrinB2 by regulating phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains/Csk binding protein. *Faseb J*. 25:3594-604.

Gerety, S.S., and D.J. Anderson. 2002. Cardiovascular ephrinB2 function is essential for embryonic angiogenesis. *Development*. 129:1397-410.

Gershony, O., T. Pe'er, M. Noach-Hirsh, N. Elia, and A. Tzur. 2014. Cytokinetic abscission is an acute G1 event. *Cell Cycle*. 13:3436-41.

Giaginis, C., G. Tsourouflis, A. Zizi-Serbetzoglou, G. Kouraklis, E. Chatzopoulou, K. Dimakopoulou, and S.E. Theocharis. 2010. Clinical significance of ephrin (eph)-A1, -A2, -a4, -a5 and -a7 receptors in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pathol Oncol Res*. 16:267-76.

Giansanti, M.G., G. Belloni, and M. Gatti. 2007. Rab11 is required for membrane trafficking and actomyosin ring constriction in meiotic cytokinesis of Drosophila males. *Mol Biol Cell*. 18:5034-47.
Giet, R., and C. Prigent. 1999. Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases. *J Cell Sci*. 112 (Pt 21):3591-601.
Gille, J. 1980. [Immunological concepts of the etiology of EPH-gestosis]. *Fortschr Med*. 98:621-5.
Gillies, T.E., and C. Cabernard. 2011. Cell division orientation in animals. *Curr Biol*. 21:R599-609.
Glotzer, M. 2009. The 3Ms of central spindle assembly: microtubules, motors and MAPs. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10:9-20.
Goldstein, S. 1974. Biological aging. An essentially normal process. *Jama*. 230:1651-2.
Goldstein, S., and D.P. Singal. 1974. Senescence of cultured human fibroblasts: mitotic versus metabolic time. *Exp Cell Res*. 88:359-64.
Goss, J.W., and D.K. Toomre. 2008. Both daughter cells traffic and exocytose membrane at the cleavage furrow during mammalian cytokinesis. *J Cell Biol*. 181:1047-54.
Gotz, M., and W.B. Huttner. 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6:777-88.
Green, R.A., J.R. Mayers, S. Wang, L. Lewellyn, A. Desai, A. Audhya, and K. Oegema. 2013. The midbody ring scaffolds the abscission machinery in the absence of midbody microtubules. *J Cell Biol*. 203:505-20.
Greenbaum, M.P., N. Iwamori, J.E. Agno, and M.M. Matzuk. 2009. Mouse TEX14 is required for embryonic germ cell intercellular bridges but not female fertility. *Biol Reprod*. 80:449-57.
Greenbaum, M.P., T. Iwamori, G.M. Buchold, and M.M. Matzuk. 2011. Germ cell intercellular bridges. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 3:a005850.
Greenbaum, M.P., L. Ma, and M.M. Matzuk. 2007. Conversion of midbodies into germ cell intercellular bridges. *Dev Biol*. 305:389-96.
Greenbaum, M.P., W. Yan, M.H. Wu, Y.N. Lin, J.E. Agno, M. Sharma, R.E. Braun, A. Rajkovic, and M.M. Matzuk. 2006. TEX14 is essential for intercellular bridges and fertility in male mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:4982-7.
Gromley, A., C. Yeaman, J. Rosa, S. Redick, C.T. Chen, S. Mirabelle, M. Guha, J. Sillibourne, and S.J. Doxsey. 2005. Centriolin anchoring of exocyst and SNARE complexes at the midbody is required for secretory-vesicle-mediated abscission. *Cell*. 123:75-87.
Gruneberg, U., R. Neef, X. Li, E.H. Chan, R.B. Chalamalasetty, E.A. Nigg, and F.A. Barr. 2006. KIF14 and citron kinase act together to promote efficient cytokinesis. *J Cell Biol*. 172:363-72.
Guertin, D.A., S. Trautmann, and D. McCollum. 2002. Cytokinesis in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev*. 66:155-78.
Guidotti, J.E., O. Bregerie, A. Robert, P. Debey, C. Brechot, and C. Desdouets. 2003. Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes. *J Biol Chem*. 278:19095-101.
Guillot, C., and T. Lecuit. 2013. Adhesion disengagement uncouples intrinsic and extrinsic forces to drive cytokinesis in epithelial tissues. *Dev Cell*. 24:227-41.
Guizetti, J., L. Schermelleh, J. Mantler, S. Maar, I. Poser, H. Leonhardt, T. Muller-Reichert, and D.W. Gerlich. 2011. Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments. *Science*. 331:1616-20.
Gurniak, C.B., and L.J. Berg. 1996. A new member of the Eph family of receptors that lacks protein tyrosine kinase activity. *Oncogene*. 13:777-86.

Halford, M.M., J. Armes, M. Buchert, V. Meskenaite, D. Grail, M.L. Hibbs, A.F. Wilks, P.G. Farlie, D.F. Newgreen, C.M. Hovens, and S.A. Stacker. 2000. Ryk-deficient mice exhibit craniofacial defects associated with perturbed Eph receptor crosstalk. *Nat Genet*. 25:414-8.

Harbott, L.K., and C.D. Nobes. 2005. A key role for Abl family kinases in EphA receptor-mediated growth cone collapse. *Mol Cell Neurosci*. 30:1-11.

Hartwell, L.H., and T.A. Weinert. 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*. 246:629-34.

Heallen, T., Y. Morikawa, J. Leach, G. Tao, J.T. Willerson, R.L. Johnson, and J.F. Martin. 2013. Hippo signaling impedes adult heart regeneration. *Development*. 140:4683-90.

Hehnly, H., and S. Doxsey. 2012. Polarity sets the stage for cytokinesis. *Mol Biol Cell*. 23:7-11.

Henkemeyer, M., O.S. Itkis, M. Ngo, P.W. Hickmott, and I.M. Ethell. 2003. Multiple EphB receptor tyrosine kinases shape dendritic spines in the hippocampus. *J Cell Biol*. 163:1313-26.

Henne, W.M., N.J. Buchkovich, Y. Zhao, and S.D. Emr. 2012. The endosomal sorting complex ESCRT-II mediates the assembly and architecture of ESCRT-III helices. *Cell*. 151:356-71.

Henriques, C.M., and M.G. Ferreira. 2012. Consequences of telomere shortening during lifespan. *Curr Opin Cell Biol*. 24:804-8.

Herath, N.I., M.D. Spanevello, S. Sabesan, T. Newton, M. Cummings, S. Duffy, D. Lincoln, G. Boyle, P.G. Parsons, and A.W. Boyd. 2006. Over-expression of Eph and ephrin genes in advanced ovarian cancer: ephrin gene expression correlates with shortened survival. *BMC Cancer*. 6:144.

Herrmann, L., T. Dittmar, and K.S. Erdmann. 2003. The protein tyrosine phosphatase PTP-BL associates with the midbody and is involved in the regulation of cytokinesis. *Mol Biol Cell*. 14:230-40.

Herszterg, S., A. Leibfried, F. Bosveld, C. Martin, and Y. Bellaiche. 2013. Interplay between the dividing cell and its neighbors regulates adherens junction formation during cytokinesis in epithelial tissue. *Dev Cell*. 24:256-70.

Herszterg, S., D. Pinheiro, and Y. Bellaiche. 2014. A multicellular view of cytokinesis in epithelial tissue. *Trends Cell Biol*. 24:285-93.

Hess, A.R., N.V. Margaryan, E.A. Seftor, and M.J. Hendrix. 2007. Deciphering the signaling events that promote melanoma tumor cell vasculogenic mimicry and their link to embryonic vasculogenesis: role of the Eph receptors. *Dev Dyn*. 236:3283-96.

Himanen, J.P., and D.B. Nikolov. 2003. Eph signaling: a structural view. *Trends Neurosci*. 26:46-51.

Himanen, J.P., K.R. Rajashankar, M. Lackmann, C.A. Cowan, M. Henkemeyer, and D.B. Nikolov. 2001. Crystal structure of an Eph receptor-ephrin complex. *Nature*. 414:933-8.

Himanen, J.P., L. Yermekbayeva, P.W. Janes, J.R. Walker, K. Xu, L. Atapattu, K.R. Rajashankar, A. Mensinga, M. Lackmann, D.B. Nikolov, and S. Dhe-Paganon. 2010. Architecture of Eph receptor clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:10860-5.

Hime, G.R., J.A. Brill, and M.T. Fuller. 1996. Assembly of ring canals in the male germ line from structural components of the contractile ring. *J Cell Sci*. 109 (Pt 12):2779-88.

Hirai, H., Y. Maru, K. Hagiwara, J. Nishida, and F. Takaku. 1987. A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. *Science*. 238:1717-20.

Hock, B., B. Bohme, T. Karn, T. Yamamoto, K. Kaibuchi, U. Holtrich, S. Holland, T. Pawson, H. Rubsamen-Waigmann, and K. Strebhardt. 1998. PDZ-domain-mediated interaction of the Eph-related receptor tyrosine kinase EphB3 and the ras-binding

protein AF6 depends on the kinase activity of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:9779-84.

Hognas, G., S. Tuomi, S. Veltel, E. Mattila, A. Murumagi, H. Edgren, O. Kallioniemi, and J. Ivaska. 2012. Cytokinesis failure due to derailed integrin traffic induces aneuploidy and oncogenic transformation in vitro and in vivo. *Oncogene*. 31:3597-606.

Holderfield, M.T., and C.C. Hughes. 2008. Crosstalk between vascular endothelial growth factor, notch, and transforming growth factor-beta in vascular morphogenesis. *Circ Res*. 102:637-52.

Holmberg, J., M. Genander, M.M. Halford, C. Anneren, M. Sondell, M.J. Chumley, R.E. Silvany, M. Henkemeyer, and J. Frisen. 2006. EphB receptors coordinate migration and proliferation in the intestinal stem cell niche. *Cell*. 125:1151-63.

Horgan, C.P., M. Walsh, T.H. Zurawski, and M.W. McCaffrey. 2004. Rab11-FIP3 localises to a Rab11-positive pericentrosomal compartment during interphase and to the cleavage furrow during cytokinesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 319:83-94.

Hornberger, M.R., D. Dutting, T. Ciossek, T. Yamada, C. Handwerker, S. Lang, F. Weth, J. Huf, R. Wessel, C. Logan, H. Tanaka, and U. Drescher. 1999. Modulation of EphA receptor function by coexpressed ephrinA ligands on retinal ganglion cell axons. *Neuron*. 22:731-42.

Hruska, M., and M.B. Dalva. 2012. Ephrin regulation of synapse formation, function and plasticity. *Mol Cell Neurosci*. 50:35-44.

Hu, C.K., M. Coughlin, C.M. Field, and T.J. Mitchison. 2011. KIF4 regulates midzone length during cytokinesis. *Curr Biol*. 21:815-24.

Hu, C.K., M. Coughlin, and T.J. Mitchison. 2012. Midbody assembly and its regulation during cytokinesis. *Mol Biol Cell*. 23:1024-34.

Hutterer, A., M. Glotzer, and M. Mishima. 2009. Clustering of centralspindlin is essential for its accumulation to the central spindle and the midbody. *Curr Biol*. 19:2043-9.

Iden, S., S. Misselwitz, S.S. Peddibhotla, H. Tuncay, D. Rehder, V. Gerke, H. Robenek, A. Suzuki, and K. Ebnet. 2012. aPKC phosphorylates JAM-A at Ser285 to promote cell contact maturation and tight junction formation. *J Cell Biol*. 196:623-39.

Ieguchi, K., T. Tomita, T. Omori, A. Komatsu, A. Deguchi, J. Masuda, S.L. Duffy, M.G. Coulthard, A. Boyd, and Y. Maru. 2014. ADAM12-cleaved ephrin-A1 contributes to lung metastasis. *Oncogene*. 33:2179-90.

Im, Y.J., and J.H. Hurley. 2008. Integrated structural model and membrane targeting mechanism of the human ESCRT-II complex. *Dev Cell*. 14:902-13.

Inoue, Y.H., M.S. Savoian, T. Suzuki, E. Mathe, M.T. Yamamoto, and D.M. Glover. 2004. Mutations in orbit/mast reveal that the central spindle is comprised of two microtubule populations, those that initiate cleavage and those that propagate furrow ingression. *J Cell Biol*. 166:49-60.

Iourov, I.Y., S.G. Vorsanova, T. Liehr, and Y.B. Yurov. 2009a. Aneuploidy in the normal, Alzheimer's disease and ataxia-telangiectasia brain: differential expression and pathological meaning. *Neurobiol Dis*. 34:212-20.

Iourov, I.Y., S.G. Vorsanova, and Y.B. Yurov. 2009b. Developmental neural chromosome instability as a possible cause of childhood brain cancers. *Med Hypotheses*. 72:615-6.

Irie, F., M. Okuno, E.B. Pasquale, and Y. Yamaguchi. 2005. EphrinB-EphB signalling regulates clathrin-mediated endocytosis through tyrosine phosphorylation of synaptojanin 1. *Nat Cell Biol*. 7:501-9.

Irie, F., and Y. Yamaguchi. 2002. EphB receptors regulate dendritic spine development via intersectin, Cdc42 and N-WASP. *Nat Neurosci*. 5:1117-8.

Irie, N., Y. Takada, Y. Watanabe, Y. Matsuzaki, C. Naruse, M. Asano, Y. Iwakura, T. Suda, and K. Matsuo. 2009. Bidirectional signaling through ephrinA2-EphA2 enhances osteoclastogenesis and suppresses osteoblastogenesis. *J Biol Chem*. 284:14637-44.

Ishii, K. 1980. Multinucleation in mouse fibroblasts cultured in methocel medium. *J Cell Physiol*. 103:105-8.

Itoh, Y., K. Tyssowski, and Y. Gotoh. 2013. Transcriptional coupling of neuronal fate commitment and the onset of migration. *Curr Opin Neurobiol*. 23:957-64.

Izawa, D., and J. Pines. 2012. Mad2 and the APC/C compete for the same site on Cdc20 to ensure proper chromosome segregation. *J Cell Biol*. 199:27-37.

Janes, P.W., B. Griesshaber, L. Atapattu, E. Nievergall, L.L. Hii, A. Mensinga, C. Chheang, B.W. Day, A.W. Boyd, P.I. Bastiaens, C. Jorgensen, T. Pawson, and M. Lackmann. 2011. Eph receptor function is modulated by heterooligomerization of A and B type Eph receptors. *J Cell Biol*. 195:1033-45.

Janes, P.W., E. Nievergall, and M. Lackmann. 2012. Concepts and consequences of Eph receptor clustering. *Semin Cell Dev Biol*. 23:43-50.

Janes, P.W., N. Saha, W.A. Barton, M.V. Kolev, S.H. Wimmer-Kleikamp, E. Nievergall, C.P. Blobel, J.P. Himanen, M. Lackmann, and D.B. Nikolov. 2005. Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell*. 123:291-304.

Janes, P.W., S.H. Wimmer-Kleikamp, A.S. Frangakis, K. Treble, B. Griesshaber, O. Sabet, M. Grabenbauer, A.Y. Ting, P. Saftig, P.I. Bastiaens, and M. Lackmann. 2009. Cytoplasmic relaxation of active Eph controls ephrin shedding by ADAM10. *PLoS Biol*. 7:e1000215.

Jiang, W., G. Jimenez, N.J. Wells, T.J. Hope, G.M. Wahl, T. Hunter, and R. Fukunaga. 1998. PRC1: a human mitotic spindle-associated CDK substrate protein required for cytokinesis. *Mol Cell*. 2:877-85.

Jiang, Y., Y. Wang, T. Wang, D.H. Hawke, Y. Zheng, X. Li, Q. Zhou, S. Majumder, E. Bi, D.X. Liu, S. Huang, and Z. Lu. 2014. PKM2 phosphorylates MLC2 and regulates cytokinesis of tumour cells. *Nat Commun*. 5:5566.

Jiao, J.W., D.A. Feldheim, and D.F. Chen. 2008. Ephrins as negative regulators of adult neurogenesis in diverse regions of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:8778-83.

Jinguji, Y., and H. Ishikawa. 1992. Electron microscopic observations on the maintenance of the tight junction during cell division in the epithelium of the mouse small intestine. *Cell Struct Funct*. 17:27-37.

Johnstone, S.R., A.K. Best, C.S. Wright, B.E. Isakson, R.J. Errington, and P.E. Martin. 2010. Enhanced connexin 43 expression delays intra-mitotic duration and cell cycle traverse independently of gap junction channel function. *J Cell Biochem*. 110:772-82.

Jorgensen, C., A. Sherman, G.I. Chen, A. Pasculescu, A. Poliakov, M. Hsiung, B. Larsen, D.G. Wilkinson, R. Linding, and T. Pawson. 2009. Cell-specific information processing in segregating populations of Eph receptor ephrin-expressing cells. *Science*. 326:1502-9.

Joseph, N., A. Hutterer, I. Poser, and M. Mishima. 2012. ARF6 GTPase protects the post-mitotic midbody from 14-3-3-mediated disintegration. *Embo J*. 31:2604-14.

Joshi, S., A.W. Braithwaite, P.J. Robinson, and M. Chircop. 2011. Dynamin inhibitors induce caspase-mediated apoptosis following cytokinesis failure in human cancer cells and this is blocked by Bcl-2 overexpression. *Mol Cancer*. 10:78.

Jurgens, G., M. Park, S. Richter, S. Touihri, C. Krause, F. El Kasmi, and U. Mayer. 2015. Plant cytokinesis: a tale of membrane traffic and fusion. *Biochem Soc Trans*. 43:73-8.

Kalo, M.S., and E.B. Pasquale. 1999. Multiple in vivo tyrosine phosphorylation sites in EphB receptors. *Biochemistry*. 38:14396-408.

Kamitori, K., M. Tanaka, T. Okuno-Hirasawa, and S. Kohsaka. 2005. Receptor related to tyrosine kinase RYK regulates cell migration during cortical development. *Biochem Biophys Res Commun*. 330:446-53.

Kanada, M., A. Nagasaki, and T.Q. Uyeda. 2005. Adhesion-dependent and contractile ring-independent equatorial furrowing during cytokinesis in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. 16:3865-72.

Kandouz, M. 2012. The Eph/Ephrin family in cancer metastasis: communication at the service of invasion. *Cancer Metastasis Rev*. 31:353-73.

Kandouz, M., K. Haidara, J. Zhao, M.L. Brisson, and G. Batist. 2010. The EphB2 tumor suppressor induces autophagic cell death via concomitant activation of the ERK1/2 and PI3K pathways. *Cell Cycle*. 9:398-407.

Kao, T.J., and A. Kania. 2011. Ephrin-mediated cis-attenuation of Eph receptor signaling is essential for spinal motor axon guidance. *Neuron*. 71:76-91.

Kao, T.J., G.C. Nicholl, J.A. Johansen, A. Kania, and A.A. Beg. 2015. alpha2-Chimaerin Is Required for Eph Receptor-Class-Specific Spinal Motor Axon Guidance and Coordinate Activation of Antagonistic Muscles. *J Neurosci*. 35:2344-57.

Kardami, E., S. Banerji, B.W. Doble, X. Dang, R.R. Fandrich, Y. Jin, and P.A. Cattini. 2003. PKC-dependent phosphorylation may regulate the ability of connexin43 to inhibit DNA synthesis. *Cell Commun Adhes*. 10:293-7.

Kasahara, K., Y. Nakayama, Y. Nakazato, K. Ikeda, T. Kuga, and N. Yamaguchi. 2007. Src signaling regulates completion of abscission in cytokinesis through ERK/MAPK activation at the midbody. *J Biol Chem*. 282:5327-39.

Katakowski, M., Z. Zhang, A.C. deCarvalho, and M. Chopp. 2005. EphB2 induces proliferation and promotes a neuronal fate in adult subventricular neural precursor cells. *Neurosci Lett*. 385:204-9.

Kechad, A., S. Jananji, Y. Ruella, and G.R. Hickson. 2012. Anillin acts as a bifunctional linker coordinating midbody ring biogenesis during cytokinesis. *Curr Biol*. 22:197-203.

Kemp, H.A., J.E. Cooke, and C.B. Moens. 2009. EphA4 and EfnB2a maintain rhombomere coherence by independently regulating intercalation of progenitor cells in the zebrafish neural keel. *Dev Biol*. 327:313-26.

Khodjakov, A., and J. Pines. 2010. Centromere tension: a divisive issue. *Nat Cell Biol*. 12:919-23.

Khodosevich, K., Y. Watanabe, and H. Monyer. 2011. EphA4 preserves postnatal and adult neural stem cells in an undifferentiated state in vivo. *J Cell Sci*. 124:1268-79.

Kiger, A.A., B. Baum, S. Jones, M.R. Jones, A. Coulson, C. Echeverri, and N. Perrimon. 2003. A functional genomic analysis of cell morphology using RNA interference. *J Biol*. 2:27.

Kim, H., F. Guo, S. Brahma, Y. Xing, and M.E. Burkard. 2014. Centralspindlin assembly and 2 phosphorylations on MgcRacGAP by Polo-like kinase 1 initiate Ect2 binding in early cytokinesis. *Cell Cycle*. 13:2952-61.

Kim, I., Y.S. Ryu, H.J. Kwak, S.Y. Ahn, J.L. Oh, G.D. Yancopoulos, N.W. Gale, and G.Y. Koh. 2002. EphB ligand, ephrinB2, suppresses the VEGF- and angiopoietin 1-induced Ras/mitogen-activated protein kinase pathway in venous endothelial cells. *Faseb J*. 16:1126-8.

Kingsbury, M.A., B. Friedman, M.J. McConnell, S.K. Rehen, A.H. Yang, D. Kaushal, and J. Chun. 2005. Aneuploid neurons are functionally active and integrated into brain circuitry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:6143-7.

Kitazawa, D., T. Matsuo, K. Kaizuka, C. Miyauchi, D. Hayashi, and Y.H. Inoue. 2014. Orbit/CLASP is required for myosin accumulation at the cleavage furrow in Drosophila male meiosis. *PLoS One*. 9:e93669.

Koch, C., and G. Laurent. 1999. Complexity and the nervous system. *Science*. 284:96-8.

Koenderink, G.H., Z. Dogic, F. Nakamura, P.M. Bendix, F.C. MacKintosh, J.H. Hartwig, T.P. Stossel, and D.A. Weitz. 2009. An active biopolymer network controlled by molecular motors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:15192-7.

Kojima, T., Y. Kokai, H. Chiba, M. Osanai, K. Kuwahara, M. Mori, Y. Mochizuki, and N. Sawada. 2001. Occludin and claudin-1 concentrate in the midbody of immortalized mouse hepatocytes during cell division. *J Histochem Cytochem*. 49:333-40.

Komurov, K., D. Padron, T. Cheng, M. Roth, K.P. Rosenblatt, and M.A. White. 2010. Comprehensive mapping of the human kinome to epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem*. 285:21134-42.

Kouranti, I., M. Sachse, N. Arouche, B. Goud, and A. Echard. 2006. Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis. *Curr Biol*. 16:1719-25.

Krawchuk, D., S. Anani, N. Honma-Yamanaka, S. Polito, M. Shafik, and Y. Yamanaka. 2015. Loss of LKB1 leads to impaired epithelial integrity and cell extrusion in the early mouse embryo. *J Cell Sci*. 128:1011-22.

Krebs, L.T., C. Starling, A.V. Chervonsky, and T. Gridley. 2010. Notch1 activation in mice causes arteriovenous malformations phenocopied by ephrinB2 and EphB4 mutants. *Genesis*. 48:146-50.

Kudryavtsev, B.N., M.V. Kudryavtseva, G.A. Sakuta, and G.I. Stein. 1993. Human hepatocyte polyploidization kinetics in the course of life cycle. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 64:387-93.

Kuo, T.C., C.T. Chen, D. Baron, T.T. Onder, S. Loewer, S. Almeida, C.M. Weismann, P. Xu, J.M. Houghton, F.B. Gao, G.Q. Daley, and S. Doxsey. 2011. Midbody accumulation through evasion of autophagy contributes to cellular reprogramming and tumorigenicity. *Nat Cell Biol*. 13:1214-23.

Lacroix, B., and A.S. Maddox. 2012. Cytokinesis, ploidy and aneuploidy. *J Pathol*. 226:338-51.

Lafaurie-Janvore, J., P. Maiuri, I. Wang, M. Pinot, J.B. Manneville, T. Betz, M. Balland, and M. Piel. 2013. ESCRT-III assembly and cytokinetic abscission are induced by tension release in the intercellular bridge. *Science*. 339:1625-9.

Lafaurie-Janvore, J., and M. Piel. 2013. [Mechanics and cell division: temporal control of abscission]. *Med Sci (Paris)*. 29:1089-91.

LaFlamme, S.E., B. Nieves, D. Colello, and C.G. Reverte. 2008. Integrins as regulators of the mitotic machinery. *Curr Opin Cell Biol*. 20:576-82.

Lai, K.O., Y. Chen, H.M. Po, K.C. Lok, K. Gong, and N.Y. Ip. 2004. Identification of the Jak/Stat proteins as novel downstream targets of EphA4 signaling in muscle: implications in the regulation of acetylcholinesterase expression. *J Biol Chem*. 279:13383-92.

LaMonica, B.E., J.H. Lui, D.V. Hansen, and A.R. Kriegstein. 2013. Mitotic spindle orientation predicts outer radial glial cell generation in human neocortex. *Nat Commun*. 4:1665.

Lancaster, O.M., M. Le Berre, A. Dimitracopoulos, D. Bonazzi, E. Zlotek-Zlotkiewicz, R. Picone, T. Duke, M. Piel, and B. Baum. 2013. Mitotic rounding alters cell geometry to ensure efficient bipolar spindle formation. *Dev Cell*. 25:270-83.

Larsen, A.B., M.W. Pedersen, M.T. Stockhausen, M.V. Grandal, B. van Deurs, and H.S. Poulsen. 2007. Activation of the EGFR gene target EphA2 inhibits epidermal growth factor-induced cancer cell motility. *Mol Cancer Res*. 5:283-93.

Larsen, A.B., M.T. Stockhausen, and H.S. Poulsen. 2010. Cell adhesion and EGFR activation regulate EphA2 expression in cancer. *Cell Signal*. 22:636-44.

Laussu, J., A. Khuong, J. Gautrais, and A. Davy. 2014. Beyond boundaries--Eph:ephrin signaling in neurogenesis. *Cell Adh Migr*. 8:349-59.

Lazarova, P., Q. Wu, G. Kvalheim, Z. Suo, K.W. Haakenstad, K. Metodiev, and J.M. Nesland. 2006. Growth factor receptors in hematopoietic stem cells: EPH family expression in CD34+ and CD133+ cell populations from mobilized peripheral blood. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 19:49-56.

Lechler, T., and E. Fuchs. 2005. Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature*. 437:275-80.

Lee, H.S., K. Mood, G. Battu, Y.J. Ji, A. Singh, and I.O. Daar. 2009. Fibroblast growth factor receptor-induced phosphorylation of ephrinB1 modulates its interaction with Dishevelled. *Mol Biol Cell*. 20:124-33.

Lee, H.S., T.G. Nishanian, K. Mood, Y.S. Bong, and I.O. Daar. 2008. EphrinB1 controls cell-cell junctions through the Par polarity complex. *Nat Cell Biol*. 10:979-86.

Lekomtsev, S., K.C. Su, V.E. Pye, K. Blight, S. Sundaramoorthy, T. Takaki, L.M. Collinson, P. Cherepanov, N. Divecha, and M. Petronczki. 2012. Centralspindlin links the mitotic spindle to the plasma membrane during cytokinesis. *Nature*. 492:276-9.

Lema Tome, C.M., E. Palma, S. Ferluga, W.T. Lowther, R. Hantgan, J. Wykosky, and W. Debinski. 2012. Structural and functional characterization of monomeric EphrinA1 binding site to EphA2 receptor. *J Biol Chem*. 287:14012-22.

Leroy, C., C. Fialin, A. Sirvent, V. Simon, S. Urbach, J. Poncet, B. Robert, P. Jouin, and S. Roche. 2009. Quantitative phosphoproteomics reveals a cluster of tyrosine kinases that mediates SRC invasive activity in advanced colon carcinoma cells. *Cancer Res*. 69:2279-86.

Lewellyn, L., J. Dumont, A. Desai, and K. Oegema. 2010. Analyzing the effects of delaying aster separation on furrow formation during cytokinesis in the Caenorhabditis elegans embryo. *Mol Biol Cell*. 21:50-62.

Li, F., X. Wang, P.C. Bunger, and A.M. Gerdes. 1997. Formation of binucleated cardiac myocytes in rat heart: I. Role of actin-myosin contractile ring. *J Mol Cell Cardiol*. 29:1541-51.

Li, G., X.D. Ji, H. Gao, J.S. Zhao, J.F. Xu, Z.J. Sun, Y.Z. Deng, S. Shi, Y.X. Feng, Y.Q. Zhu, T. Wang, J.J. Li, and D. Xie. 2012. EphB3 suppresses non-small-cell lung cancer metastasis via a PP2A/RACK1/Akt signalling complex. *Nat Commun*. 3:667.

Li, J.J., D.P. Liu, G.T. Liu, and D. Xie. 2009. EphrinA5 acts as a tumor suppressor in glioma by negative regulation of epidermal growth factor receptor. *Oncogene*. 28:1759-68.

Lickliter, J.D., F.M. Smith, J.E. Olsson, K.L. Mackwell, and A.W. Boyd. 1996. Embryonic stem cells express multiple Eph-subfamily receptor tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:145-50.

Lim, Y.S., T. McLaughlin, T.C. Sung, A. Santiago, K.F. Lee, and D.D. O'Leary. 2008. p75(NTR) mediates ephrin-A reverse signaling required for axon repulsion and mapping. *Neuron*. 59:746-58.

Liu, D., G. Vader, M.J. Vromans, M.A. Lampson, and S.M. Lens. 2009. Sensing chromosome bi-orientation by spatial separation of aurora B kinase from kinetochore substrates. *Science*. 323:1350-3.

Liu, D.P., Y. Wang, H.P. Koeffler, and D. Xie. 2007. Ephrin-A1 is a negative regulator in glioma through down-regulation of EphA2 and FAK. *Int J Oncol*. 30:865-71.

Liu, J., G.D. Fairn, D.F. Ceccarelli, F. Sicheri, and A. Wilde. 2012. Cleavage furrow organization requires PIP(2)-mediated recruitment of anillin. *Curr Biol*. 22:64-9.

Liu, J., J. Li, Y. Ren, and P. Liu. 2014. DLG5 in cell polarity maintenance and cancer development. *Int J Biol Sci*. 10:543-9.

Liu, J., X. Tang, H. Wang, S. Oliferenko, and M.K. Balasubramanian. 2002a. The localization of the integral membrane protein Cps1p to the cell division site is dependent on the actomyosin ring and the septation-inducing network in Schizosaccharomyces pombe. *Mol Biol Cell*. 13:989-1000.

Liu, W., S.A. Ahmad, Y.D. Jung, N. Reinmuth, F. Fan, C.D. Bucana, and L.M. Ellis. 2002b. Coexpression of ephrin-Bs and their receptors in colon carcinoma. *Cancer*. 94:934-9.

Liu, Z., S. Yue, X. Chen, T. Kubin, and T. Braun. 2010. Regulation of cardiomyocyte polyploidy and multinucleation by CyclinG1. *Circ Res*. 106:1498-506.

Logan, M.R., and C.A. Mandato. 2006. Regulation of the actin cytoskeleton by PIP2 in cytokinesis. *Biol Cell*. 98:377-88.

Lopez-Sanchez, N., and J.M. Frade. 2013. Genetic evidence for p75NTR-dependent tetraploidy in cortical projection neurons from adult mice. *J Neurosci*. 33:7488-500.

Luxey, M., T. Jungas, J. Laussu, C. Audouard, A. Garces, and A. Davy. 2013. Eph:ephrin-B1 forward signaling controls fasciculation of sensory and motor axons. *Dev Biol*. 383:264-74.

Luxey, M., J. Laussu, T. Jungas, and A. Davy. 2011. Generation of transgenic mice overexpressing EfnB2 in endothelial cells. *Genesis*. 49:811-20.

Lyons-Warren, A., J.J. Chang, R. Balkissoon, A. Kamiya, M. Garant, J. Nurnberger, W. Scheftner, T. Reich, F. McMahon, J. Kelsoe, E. Gershon, W. Coryell, W. Byerley, W. Berrettini, R. Depaulo, M. McInnis, and A. Sawa. 2005. Evidence of association between bipolar disorder and Citron on chromosome 12q24. *Mol Psychiatry*. 10:807-9.

Machicoane, M., C.A. de Frutos, J. Fink, M. Rocancourt, Y. Lombardi, S. Garel, M. Piel, and A. Echard. 2014. SLK-dependent activation of ERMs controls LGN-NuMA localization and spindle orientation. *J Cell Biol*. 205:791-9.

Madaule, P., M. Eda, N. Watanabe, K. Fujisawa, T. Matsuoka, H. Bito, T. Ishizaki, and S. Narumiya. 1998. Role of citron kinase as a target of the small GTPase Rho in cytokinesis. *Nature*. 394:491-4.

Madaule, P., T. Furuyashiki, T. Reid, T. Ishizaki, G. Watanabe, N. Morii, and S. Narumiya. 1995. A novel partner for the GTP-bound forms of rho and rac. *FEBS Lett*. 377:243-8.

Makyio, H., M. Ohgi, T. Takei, S. Takahashi, H. Takatsu, Y. Katoh, A. Hanai, T. Ueda, Y. Kanaho, Y. Xie, H.W. Shin, H. Kamikubo, M. Kataoka, M. Kawasaki, R. Kato, S. Wakatsuki, and K. Nakayama. 2012. Structural basis for Arf6-MKLP1 complex formation on the Flemming body responsible for cytokinesis. *Embo J*. 31:2590-603.

Malumbres, M., and M. Barbacid. 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. 9:153-66.

Mansson-Broberg, A., A.J. Siddiqui, M. Genander, K.H. Grinnemo, X. Hao, A.B. Andersson, E. Wardell, C. Sylven, and M. Corbascio. 2008. Modulation of ephrinB2 leads to increased angiogenesis in ischemic myocardium and endothelial cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*. 373:355-9.

Marler, K.J., E. Becker-Barroso, A. Martinez, M. Llovera, C. Wentzel, S. Poopalasundaram, R. Hindges, E. Soriano, J. Comella, and U. Drescher. 2008. A TrkB/EphrinA interaction controls retinal axon branching and synaptogenesis. *J Neurosci*. 28:12700-12.

Marston, D.J., S. Dickinson, and C.D. Nobes. 2003. Rac-dependent trans-endocytosis of ephrinBs regulates Eph-ephrin contact repulsion. *Nat Cell Biol*. 5:879-88.

Marthiens, V., I. Kazanis, L. Moss, K. Long, and C. Ffrench-Constant. 2010. Adhesion molecules in the stem cell niche--more than just staying in shape? *J Cell Sci*. 123:1613-22.

Martin-Serrano, J., T. Zang, and P.D. Bieniasz. 2003. Role of ESCRT-I in retroviral budding. *J Virol*. 77:4794-804.

Martiny-Baron, G., T. Korff, F. Schaffner, N. Esser, S. Eggstein, D. Marme, and H.G. Augustin. 2004. Inhibition of tumor growth and angiogenesis by soluble EphB4. *Neoplasia*. 6:248-57.

Marzesco, A.M., P. Janich, M. Wilsch-Brauninger, V. Dubreuil, K. Langenfeld, D. Corbeil, and W.B. Huttner. 2005. Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J Cell Sci*. 118:2849-58.

Mathe, E., Y.H. Inoue, W. Palframan, G. Brown, and D.M. Glover. 2003. Orbit/Mast, the CLASP orthologue of Drosophila, is required for asymmetric stem cell and cystocyte divisions and development of the polarised microtubule network that interconnects oocyte and nurse cells during oogenesis. *Development*. 130:901-15.

Mathew, S.S., B. Nieves, S. Sequeira, S. Sambandamoorthy, K. Pumiglia, M. Larsen, and S.E. Laflamme. 2014. Integrins promote cytokinesis through the RSK signaling axis. *J Cell Sci*. 127:534-45.

Matsumura, F. 2005. Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. *Trends Cell Biol*. 15:371-7.

McClelland, A.C., S.I. Sheffler-Collins, M.S. Kayser, and M.B. Dalva. 2009. Ephrin-B1 and ephrin-B2 mediate EphB-dependent presynaptic development via syntenin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:20487-92.

McIntosh, J.R., and S.C. Landis. 1971. The distribution of spindle microtubules during mitosis in cultured human cells. *J Cell Biol*. 49:468-97.

Mellitzer, G., Q. Xu, and D.G. Wilkinson. 1999. Eph receptors and ephrins restrict cell intermingling and communication. *Nature*. 400:77-81.

Mendes Pinto, I., B. Rubinstein, and R. Li. 2013. Force to divide: structural and mechanical requirements for actomyosin ring contraction. *Biophys J*. 105:547-54.

Meng, W., and M. Takeichi. 2009. Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1:a002899.

Menon, M.B., and M. Gaestel. 2015. Sep(t)arate or not - how some cells take septin-independent routes through cytokinesis. *J Cell Sci*.

Miao, H., N.W. Gale, H. Guo, J. Qian, A. Petty, J. Kaspar, A.J. Murphy, D.M. Valenzuela, G. Yancopoulos, D. Hambardzumyan, J.D. Lathia, J.N. Rich, J. Lee, and B. Wang. 2014. EphA2 promotes infiltrative invasion of glioma stem cells in vivo through cross-talk with Akt and regulates stem cell properties. *Oncogene*. 34:558-67.

Miao, H., N.W. Gale, H. Guo, J. Qian, A. Petty, J. Kaspar, A.J. Murphy, D.M. Valenzuela, G. Yancopoulos, D. Hambardzumyan, J.D. Lathia, J.N. Rich, J. Lee, and B. Wang. 2015. EphA2 promotes infiltrative invasion of glioma stem cells in vivo through cross-talk with Akt and regulates stem cell properties. *Oncogene*. 34:558-67.

Miao, H., B.R. Wei, D.M. Peehl, Q. Li, T. Alexandrou, J.R. Schelling, J.S. Rhim, J.R. Sedor, E. Burnett, and B. Wang. 2001. Activation of EphA receptor tyrosine kinase inhibits the Ras/MAPK pathway. *Nat Cell Biol*. 3:527-30.

Mierzwa, B., and D.W. Gerlich. 2014. Cytokinetic Abscission: Molecular Mechanisms and Temporal Control. *Dev Cell*. 31:525-538.

Miller, A.L., and W.M. Bement. 2009. Regulation of cytokinesis by Rho GTPase flux. *Nat Cell Biol*. 11:71-7.

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

Mishima, M., V. Pavicic, U. Gruneberg, E.A. Nigg, and M. Glotzer. 2004. Cell cycle regulation of central spindle assembly. *Nature*. 430:908-13.

Miyauchi, C., D. Kitazawa, I. Ando, D. Hayashi, and Y.H. Inoue. 2013. Orbit/CLASP is required for germline cyst formation through its developmental control of fusomes and ring canals in Drosophila males. *PLoS One*. 8:e58220.

Mohr, S.E., J.A. Smith, C.E. Shamu, R.A. Neumuller, and N. Perrimon. 2014. RNAi screening comes of age: improved techniques and complementary approaches. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 15:591-600.

Mollinari, C., J.P. Kleman, Y. Saoudi, S.A. Jablonski, J. Perard, T.J. Yen, and R.L. Margolis. 2005. Ablation of PRC1 by small interfering RNA demonstrates that cytokinetic abscission requires a central spindle bundle in mammalian cells, whereas completion of furrowing does not. *Mol Biol Cell*. 16:1043-55.

Mollova, M., K. Bersell, S. Walsh, J. Savla, L.T. Das, S.Y. Park, L.E. Silberstein, C.G. Dos Remedios, D. Graham, S. Colan, and B. Kuhn. 2013. Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:1446-51.

Mondal, G., A. Ohashi, L. Yang, M. Rowley, and F.J. Couch. 2014. Tex14, a Plk1-regulated protein, is required for kinetochore-microtubule attachment and regulation of the spindle assembly checkpoint. *Mol Cell*. 45:680-95.

Montagnac, G., and P. Chavrier. 2010. Abscission accomplished by PtdIns(3)P. *Nat Cell Biol*. 12:308-10.

Morais-de-Sa, E., and C. Sunkel. 2013. Adherens junctions determine the apical position of the midbody during follicular epithelial cell division. *EMBO Rep*. 14:696-703.

Morin, X., and Y. Bellaiche. 2011. Mitotic spindle orientation in asymmetric and symmetric cell divisions during animal development. *Dev Cell*. 21:102-19.

Morin, X., F. Jaouen, and P. Durbec. 2007. Control of planar divisions by the G-protein regulator LGN maintains progenitors in the chick neuroepithelium. *Nat Neurosci*. 10:1440-8.

Morita, E., V. Sandrin, H.Y. Chung, S.G. Morham, S.P. Gygi, C.K. Rodesch, and W.I. Sundquist. 2007. Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *Embo J*. 26:4215-27.

Mullins, J.M., and J.J. Biesele. 1977. Terminal phase of cytokinesis in D-98s cells. *J Cell Biol*. 73:672-84.

Muotri, A.R., and F.H. Gage. 2006. Generation of neuronal variability and complexity. *Nature*. 441:1087-93.

Murata-Hori, M., and Y.L. Wang. 2002. Both midzone and astral microtubules are involved in the delivery of cytokinesis signals: insights from the mobility of aurora B. *J Cell Biol*. 159:45-53.

Murthy, M., R. Ranjan, N. Denef, M.E. Higashi, T. Schupbach, and T.L. Schwarz. 2005. Sec6 mutations and the Drosophila exocyst complex. *J Cell Sci*. 118:1139-50.

Naim, V., S. Imarisio, F. Di Cunto, M. Gatti, and S. Bonaccorsi. 2004. Drosophila citron kinase is required for the final steps of cytokinesis. *Mol Biol Cell*. 15:5053-63.

Nakada, M., E.M. Anderson, T. Demuth, S. Nakada, L.B. Reavie, K.L. Drake, D.B. Hoelzinger, and M.E. Berens. 2010. The phosphorylation of ephrin-B2 ligand promotes glioma cell migration and invasion. *Int J Cancer*. 126:1155-65.

Nakada, M., K.L. Drake, S. Nakada, J.A. Niska, and M.E. Berens. 2006. Ephrin-B3 ligand promotes glioma invasion through activation of Rac1. *Cancer Res*. 66:8492-500.

Nakada, M., J.A. Niska, H. Miyamori, W.S. McDonough, J. Wu, H. Sato, and M.E. Berens. 2004. The phosphorylation of EphB2 receptor regulates migration and invasion of human glioma cells. *Cancer Res*. 64:3179-85.

Naudin, C., A. Sirvent, C. Leroy, R. Larive, V. Simon, J. Pannequin, J.F. Bourgaux, J. Pierre, B. Robert, F. Hollande, and S. Roche. 2014. SLAP displays tumour suppressor functions in colorectal cancer via destabilization of the SRC substrate EPHA2. *Nat Commun*. 5:3159.

Neto, H., G. Balmer, and G. Gould. 2013. Exocyst proteins in cytokinesis: Regulation by Rab11. *Commun Integr Biol*. 6:e27635.

Ng, M.M., F. Chang, and D.R. Burgess. 2005. Movement of membrane domains and requirement of membrane signaling molecules for cytokinesis. *Dev Cell*. 9:781-90.

Nicklas, R.B., and C.A. Koch. 1969. Chromosome micromanipulation. 3. Spindle fiber tension and the reorientation of mal-oriented chromosomes. *J Cell Biol*. 43:40-50.

Nicodemus, K.K., J.H. Callicott, R.G. Higier, A. Luna, D.C. Nixon, B.K. Lipska, R. Vakkalanka, I. Giegling, D. Rujescu, D. St Clair, P. Muglia, Y.Y. Shugart, and D.R. Weinberger. 2010. Evidence of statistical epistasis between DISC1, CIT and NDEL1 impacting risk for schizophrenia: biological validation with functional neuroimaging. *Hum Genet*. 127:441-52.

Nievergall, E., P.W. Janes, C. Stegmayer, M.E. Vail, F.G. Haj, S.W. Teng, B.G. Neel, P.I. Bastiaens, and M. Lackmann. 2010. PTP1B regulates Eph receptor function and trafficking. *J Cell Biol*. 191:1189-203.

Ninkovic, J., and M. Gotz. 2007. Signaling in adult neurogenesis: from stem cell niche to neuronal networks. *Curr Opin Neurobiol*. 17:338-44.

Nishimura, Y., and S. Yonemura. 2006. Centralspindlin regulates ECT2 and RhoA accumulation at the equatorial cortex during cytokinesis. *J Cell Sci*. 119:104-14.

Nomura, T., C. Goritz, T. Catchpole, M. Henkemeyer, and J. Frisen. 2010. EphB signaling controls lineage plasticity of adult neural stem cell niche cells. *Cell Stem Cell*. 7:730-43.

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

North, H.A., X. Zhao, S.M. Kolk, M.A. Clifford, D.M. Ziskind, and M.J. Donoghue. 2009. Promotion of proliferation in the developing cerebral cortex by EphA4 forward signaling. *Development*. 136:2467-76.

Odell, G.M., and V.E. Foe. 2008. An agent-based model contrasts opposite effects of dynamic and stable microtubules on cleavage furrow positioning. *J Cell Biol*. 183:471-83.

Ojima, T., H. Takagi, K. Suzuma, H. Oh, I. Suzuma, H. Ohashi, D. Watanabe, E. Suganami, T. Murakami, M. Kurimoto, Y. Honda, and N. Yoshimura. 2006. EphrinA1 inhibits vascular endothelial growth factor-induced intracellular signaling and suppresses retinal neovascularization and blood-retinal barrier breakdown. *Am J Pathol*. 168:331-9.

Okumura, M., A.M. Katsuyama, H. Shibata, and M. Maki. 2013. VPS37 isoforms differentially modulate the ternary complex formation of ALIX, ALG-2, and ESCRT-I. *Biosci Biotechnol Biochem*. 77:1715-21.

Otegui, M.S., K.J. Verbrugghe, and A.R. Skop. 2005. Midbodies and phragmoplasts: analogous structures involved in cytokinesis. *Trends Cell Biol*. 15:404-13.

Ottone, C., B. Krusche, A. Whitby, M. Clements, G. Quadrato, M.E. Pitulescu, R.H. Adams, and S. Parrinello. 2014. Direct cell-cell contact with the vascular niche maintains quiescent neural stem cells. *Nat Cell Biol*. 16:1045-56.

Ou, G., C. Gentili, and P. Gonczy. 2014. Stereotyped distribution of midbody remnants in early C. elegans embryos requires cell death genes and is dispensable for development. *Cell Res*. 24:251-3.

Pajalunga, D., A. Mazzola, A.M. Salzano, M.G. Biferi, G. De Luca, and M. Crescenzi. 2007. Critical requirement for cell cycle inhibitors in sustaining nonproliferative states. *J Cell Biol*. 176:807-18.

Pakkenberg, B., D. Pelvig, L. Marner, M.J. Bundgaard, H.J. Gundersen, J.R. Nyengaard, and L. Regeur. 2003. Aging and the human neocortex. *Exp Gerontol*. 38:95-9.

Palmer, A., M. Zimmer, K.S. Erdmann, V. Eulenburg, A. Porthin, R. Heumann, U. Deutsch, and R. Klein. 2002. EphrinB phosphorylation and reverse signaling: regulation by Src kinases and PTP-BL phosphatase. *Mol Cell*. 9:725-37.

Park, E.K., N. Warner, Y.S. Bong, D. Stapleton, R. Maeda, T. Pawson, and I.O. Daar. 2004. Ectopic EphA4 receptor induces posterior protrusions via FGF signaling in Xenopus embryos. *Mol Biol Cell*. 15:1647-55.

Parker, M., R. Roberts, M. Enriquez, X. Zhao, T. Takahashi, D. Pat Cerretti, T. Daniel, and J. Chen. 2004. Reverse endocytosis of transmembrane ephrin-B ligands via a clathrin-mediated pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 323:17-23.

Parri, M., F. Buricchi, E. Giannoni, G. Grimaldi, T. Mello, G. Raugei, G. Ramponi, and P. Chiarugi. 2007. EphrinA1 activates a Src/focal adhesion kinase-mediated motility response leading to rho-dependent actino/myosin contractility. *J Biol Chem*. 282:19619-28.

Pasquale, E.B. 2010. Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond. *Nat Rev Cancer*. 10:165-80.

Pavicic-Kaltenbrunner, V., M. Mishima, and M. Glotzer. 2007. Cooperative assembly of CYK-4/MgcRacGAP and ZEN-4/MKLP1 to form the centralspindlin complex. *Mol Biol Cell*. 18:4992-5003.

Pelissier, A., J.P. Chauvin, and T. Lecuit. 2003. Trafficking through Rab11 endosomes is required for cellularization during Drosophila embryogenesis. *Curr Biol*. 13:1848-57.

Penzes, P., A. Beeser, J. Chernoff, M.R. Schiller, B.A. Eipper, R.E. Mains, and R.L. Huganir. 2003. Rapid induction of dendritic spine morphogenesis by trans-synaptic ephrinB-EphB receptor activation of the Rho-GEF kalirin. *Neuron*. 37:263-74.

Peyre, E., F. Jaouen, M. Saadaoui, L. Haren, A. Merdes, P. Durbec, and X. Morin. 2011. A lateral belt of cortical LGN and NuMA guides mitotic spindle movements and planar division in neuroepithelial cells. *J Cell Biol*. 193:141-54.

Pfaff, D., U. Fiedler, and H.G. Augustin. 2006. Emerging roles of the Angiopoietin-Tie and the ephrin-Eph systems as regulators of cell trafficking. *J Leukoc Biol*. 80:719-26.

Piekny, A.J., and M. Glotzer. 2008. Anillin is a scaffold protein that links RhoA, actin, and myosin during cytokinesis. *Curr Biol*. 18:30-6.

Pikor, L., K. Thu, E. Vucic, and W. Lam. 2013. The detection and implication of genome instability in cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 32:341-52.

Piperno, G., M. LeDizet, and X.J. Chang. 1987. Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. *J Cell Biol*. 104:289-302.

Pires, R., B. Hartlieb, L. Signor, G. Schoehn, S. Lata, M. Roessle, C. Moriscot, S. Popov, A. Hinz, M. Jamin, V. Boyer, R. Sadoul, E. Forest, D.I. Svergun, H.G. Gottlinger, and W. Weissenhorn. 2009. A crescent-shaped ALIX dimer targets ESCRT-III CHMP4 filaments. *Structure*. 17:843-56.

Pitulescu, M.E., and R.H. Adams. 2010. Eph/ephrin molecules--a hub for signaling and endocytosis. *Genes Dev*. 24:2480-92.

Pohl, C. 2009. Dual control of cytokinesis by the ubiquitin and autophagy pathways. *Autophagy*. 5:561-2.

Pohl, C., and S. Jentsch. 2008a. Final stages of cytokinesis and midbody ring formation are controlled by BRUCE. *Cell*. 132:832-45.
Pohl, C., and S. Jentsch. 2008b. Regulation of apoptosis and cytokinesis by the anti-apoptotic E2/E3 ubiquitin-ligase BRUCE. *Ernst Schering Found Symp Proc*:115-26.
Pohl, C., and S. Jentsch. 2009. Midbody ring disposal by autophagy is a post-abscission event of cytokinesis. *Nat Cell Biol*. 11:65-70.
Poliakov, A., M.L. Cotrina, A. Pasini, and D.G. Wilkinson. 2008. Regulation of EphB2 activation and cell repulsion by feedback control of the MAPK pathway. *J Cell Biol*. 183:933-47.
Pollarolo, G., J.G. Schulz, S. Munck, and C.G. Dotti. 2011. Cytokinesis remnants define first neuronal asymmetry in vivo. *Nat Neurosci*. 14:1525-33.
Prevost, N., D. Woulfe, T. Tanaka, and L.F. Brass. 2002. Interactions between Eph kinases and ephrins provide a mechanism to support platelet aggregation once cell-to-cell contact has occurred. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:9219-24.
Puliafito, A., L. Hufnagel, P. Neveu, S. Streichan, A. Sigal, D.K. Fygenson, and B.I. Shraiman. 2012. Collective and single cell behavior in epithelial contact inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109:739-44.
Putsep, K., S. Normark, and H.G. Boman. 1999. The origin of cecropins; implications from synthetic peptides derived from ribosomal protein L1. *FEBS Lett*. 451:249-52.
Qin, H., R. Noberini, X. Huan, J. Shi, E.B. Pasquale, and J. Song. 2010. Structural characterization of the EphA4-Ephrin-B2 complex reveals new features enabling Eph-ephrin binding promiscuity. *J Biol Chem*. 285:644-54.
Qiu, R., X. Wang, A. Davy, C. Wu, K. Murai, H. Zhang, J.G. Flanagan, P. Soriano, and Q. Lu. 2008. Regulation of neural progenitor cell state by ephrin-B. *J Cell Biol*. 181:973-83.
Ragkousi, K., and M.C. Gibson. 2014. Cell division and the maintenance of epithelial order. *J Cell Biol*. 207:181-8.
Rakic, P. 1995. A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. *Trends Neurosci*. 18:383-8.
Rayment, I., H.M. Holden, M. Whittaker, C.B. Yohn, M. Lorenz, K.C. Holmes, and R.A. Milligan. 1993. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science*. 261:58-65.
Raymond, C.K., I. Howald-Stevenson, C.A. Vater, and T.H. Stevens. 1992. Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Mol Biol Cell*. 3:1389-402.
Rehen, S.K., M.J. McConnell, D. Kaushal, M.A. Kingsbury, A.H. Yang, and J. Chun. 2001. Chromosomal variation in neurons of the developing and adult mammalian nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:13361-6.
Rehen, S.K., Y.C. Yung, M.P. McCreight, D. Kaushal, A.H. Yang, B.S. Almeida, M.A. Kingsbury, K.M. Cabral, M.J. McConnell, B. Anliker, M. Fontanoz, and J. Chun. 2005. Constitutional aneuploidy in the normal human brain. *J Neurosci*. 25:2176-80.
Ren, X., and J.H. Hurley. 2011. Structural basis for endosomal recruitment of ESCRT-I by ESCRT-0 in yeast. *Embo J*. 30:2130-9.
Repetto, D., P. Camera, R. Melani, N. Morello, I. Russo, E. Calcagno, R. Tomasoni, F. Bianchi, G. Berto, M. Giustetto, N. Berardi, T. Pizzorusso, M. Matteoli, P. Di Stefano, M. Missler, E. Turco, F. Di Cunto, and P. Defilippi. 2014. p140Cap regulates memory and synaptic plasticity through Src-mediated and citron-N-mediated actin reorganization. *J Neurosci*. 34:1542-53.

Reverte, C.G., A. Benware, C.W. Jones, and S.E. LaFlamme. 2006. Perturbing integrin function inhibits microtubule growth from centrosomes, spindle assembly, and cytokinesis. *J Cell Biol*. 174:491-7.

Rodenas-Ruano, A., M.A. Perez-Pinzon, E.J. Green, M. Henkemeyer, and D.J. Liebl. 2006. Distinct roles for ephrinB3 in the formation and function of hippocampal synapses. *Dev Biol*. 292:34-45.

Rohme, D. 1981. Evidence for a relationship between longevity of mammalian species and life spans of normal fibroblasts in vitro and erythrocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 78:5009-13.

Rosa, J., P. Canovas, A. Islam, D.C. Altieri, and S.J. Doxsey. 2006. Survivin modulates microtubule dynamics and nucleation throughout the cell cycle. *Mol Biol Cell*. 17:1483-93.

Roubinet, C., and C. Cabernard. 2014. Control of asymmetric cell division. *Curr Opin Cell Biol*. 31:84-91.

Ruchaud, S., M. Carmena, and W.C. Earnshaw. 2007. The chromosomal passenger complex: one for all and all for one. *Cell*. 131:230-1.

Saadaoui, M., M. Machicoane, F. di Pietro, F. Etoc, A. Echard, and X. Morin. 2014. Dlg1 controls planar spindle orientation in the neuroepithelium through direct interaction with LGN. *J Cell Biol*. 206:707-17.

Saeter, G., P.E. Schwarze, J.M. Nesland, N. Juul, E.O. Pettersen, and P.O. Seglen. 1988. The polyploidizing growth pattern of normal rat liver is replaced by divisional, diploid growth in hepatocellular nodules and carcinomas. *Carcinogenesis*. 9:939-45.

Sahin, M., P.L. Greer, M.Z. Lin, H. Poucher, J. Eberhart, S. Schmidt, T.M. Wright, S.M. Shamah, S. O'Connell, C.W. Cowan, L. Hu, J.L. Goldberg, A. Debant, G. Corfas, C.E. Krull, and M.E. Greenberg. 2005. Eph-dependent tyrosine phosphorylation of ephexin1 modulates growth cone collapse. *Neuron*. 46:191-204.

Saksena, S., J. Wahlman, D. Teis, A.E. Johnson, and S.D. Emr. 2009. Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell*. 136:97-109.

Salzmann, V., C. Chen, C.Y. Chiang, A. Tiyaboonchai, M. Mayer, and Y.M. Yamashita. 2014. Centrosome-dependent asymmetric inheritance of the midbody ring in Drosophila germline stem cell division. *Mol Biol Cell*. 25:267-75.

Sampath, S.C., R. Ohi, O. Leismann, A. Salic, A. Pozniakovski, and H. Funabiki. 2004. The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. *Cell*. 118:187-202.

Sarkisian, M.R., W. Li, F. Di Cunto, S.R. D'Mello, and J.J. LoTurco. 2002. Citron-kinase, a protein essential to cytokinesis in neuronal progenitors, is deleted in the flathead mutant rat. *J Neurosci*. 22:RC217.

Sato, K., T. Suzuki, Y. Yamaguchi, Y. Kitade, T. Nagase, and H. Ueda. 2014. PLEKHG2/FLJ00018, a Rho family-specific guanine nucleotide exchange factor, is tyrosine phosphorylated via the EphB2/cSrc signaling pathway. *Cell Signal*. 26:691-6.

Saurin, A.T., J. Durgan, A.J. Cameron, A. Faisal, M.S. Marber, and P.J. Parker. 2008. The regulated assembly of a PKCepsilon complex controls the completion of cytokinesis. *Nat Cell Biol*. 10:891-901.

Sawamiphak, S., S. Seidel, C.L. Essmann, G.A. Wilkinson, M.E. Pitulescu, T. Acker, and A. Acker-Palmer. 2010. Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis. *Nature*. 465:487-91.

Schiel, J.A., G.C. Simon, C. Zaharris, J. Weisz, D. Castle, C.C. Wu, and R. Prekeris. 2012. FIP3-endosome-dependent formation of the secondary ingression mediates ESCRT-III recruitment during cytokinesis. *Nat Cell Biol*. 14:1068-78.

Schulze, E.S., and S.H. Blose. 1984. Passage of molecules across the intercellular bridge between post-mitotic daughter cells. *Exp Cell Res*. 151:367-73.
Schweitzer, J.K., and C. D'Souza-Schorey. 2004. Finishing the job: cytoskeletal and membrane events bring cytokinesis to an end. *Exp Cell Res*. 295:1-8.
Schweitzer, J.K., and C. D'Souza-Schorey. 2005. A requirement for ARF6 during the completion of cytokinesis. *Exp Cell Res*. 311:74-83.
Scott, A., J. Gaspar, M.D. Stuchell-Brereton, S.L. Alam, J.J. Skalicky, and W.I. Sundquist. 2005. Structure and ESCRT-III protein interactions of the MIT domain of human VPS4A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:13813-8.
Scully, A.L., M. McKeown, and J.B. Thomas. 1999. Isolation and characterization of Dek, a Drosophila eph receptor protein tyrosine kinase. *Mol Cell Neurosci*. 13:337-47.
Seglen, P.O. 1997. DNA ploidy and autophagic protein degradation as determinants of hepatocellular growth and survival. *Cell Biol Toxicol*. 13:301-15.
Segura, I., C.L. Essmann, S. Weinges, and A. Acker-Palmer. 2007. Grb4 and GIT1 transduce ephrinB reverse signals modulating spine morphogenesis and synapse formation. *Nat Neurosci*. 10:301-10.
Senturk, A., S. Pfennig, A. Weiss, K. Burk, and A. Acker-Palmer. 2011. Ephrin Bs are essential components of the Reelin pathway to regulate neuronal migration. *Nature*. 472:356-60.
Serres, M.P., U. Kossatz, Y. Chi, J.M. Roberts, N.P. Malek, and A. Besson. 2012. p27(Kip1) controls cytokinesis via the regulation of citron kinase activation. *J Clin Invest*. 122:844-58.
Shamah, S.M., M.Z. Lin, J.L. Goldberg, S. Estrach, M. Sahin, L. Hu, M. Bazalakova, R.L. Neve, G. Corfas, A. Debant, and M.E. Greenberg. 2001. EphA receptors regulate growth cone dynamics through the novel guanine nucleotide exchange factor ephexin. *Cell*. 105:233-44.
Shestakova, A., M. Curtiss, B.A. Davies, D.J. Katzmann, and M. Babst. 2013. The linker region plays a regulatory role in assembly and activity of the Vps4 AAA ATPase. *J Biol Chem*. 288:26810-9.
Shi, Y., C.G. Pontrello, K.A. DeFea, L.F. Reichardt, and I.M. Ethell. 2009. Focal adhesion kinase acts downstream of EphB receptors to maintain mature dendritic spines by regulating cofilin activity. *J Neurosci*. 29:8129-42.
Shintani, T., M. Ihara, H. Sakuta, H. Takahashi, I. Watakabe, and M. Noda. 2006. Eph receptors are negatively controlled by protein tyrosine phosphatase receptor type O. *Nat Neurosci*. 9:761-9.
Shitamukai, A., and F. Matsuzaki. 2012. Control of asymmetric cell division of mammalian neural progenitors. *Dev Growth Differ*. 54:277-86.
Shrestha, S., L.J. Wilmeth, J. Eyer, and C.B. Shuster. 2012. PRC1 controls spindle polarization and recruitment of cytokinetic factors during monopolar cytokinesis. *Mol Biol Cell*. 23:1196-207.
Shuster, C.B., and D.R. Burgess. 2002. Targeted new membrane addition in the cleavage furrow is a late, separate event in cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:3633-8.
Sikkema, A.H., W.F. den Dunnen, E. Hulleman, D.G. van Vuurden, G. Garcia-Manero, H. Yang, F.J. Scherpen, K.R. Kampen, E.W. Hoving, W.A. Kamps, S.H. Diks, M.P. Peppelenbosch, and E.S. de Bont. 2012. EphB2 activity plays a pivotal role in pediatric medulloblastoma cell adhesion and invasion. *Neuro Oncol*. 14:1125-35.
Sikkema, W.K., A. Strikwerda, M. Sharma, K. Assi, B. Salh, M.E. Cox, and J. Mills. 2014. Regulation of mitotic cytoskeleton dynamics and cytokinesis by integrin-linked kinase in retinoblastoma cells. *PLoS One*. 9:e98838.

Simon, G.C., and R. Prekeris. 2008. The role of FIP3-dependent endosome transport during cytokinesis. *Commun Integr Biol*. 1:132-3.

Simon, G.C., E. Schonteich, C.C. Wu, A. Piekny, D. Ekiert, X. Yu, G.W. Gould, M. Glotzer, and R. Prekeris. 2008. Sequential Cyk-4 binding to ECT2 and FIP3 regulates cleavage furrow ingression and abscission during cytokinesis. *Embo J*. 27:1791-803.

Singh, D., and C. Pohl. 2014. Coupling of rotational cortical flow, asymmetric midbody positioning, and spindle rotation mediates dorsoventral axis formation in C. elegans. *Dev Cell*. 28:253-67.

Singla, N., H. Erdjument-Bromage, J.P. Himanen, T.W. Muir, and D.B. Nikolov. 2011. A semisynthetic Eph receptor tyrosine kinase provides insight into ligand-induced kinase activation. *Chem Biol*. 18:361-71.

Skop, A.R., D. Bergmann, W.A. Mohler, and J.G. White. 2001. Completion of cytokinesis in C. elegans requires a brefeldin A-sensitive membrane accumulation at the cleavage furrow apex. *Curr Biol*. 11:735-46.

Skop, A.R., H. Liu, J. Yates, 3rd, B.J. Meyer, and R. Heald. 2004. Dissection of the mammalian midbody proteome reveals conserved cytokinesis mechanisms. *Science*. 305:61-6.

Slagsvold, T., R. Aasland, S. Hirano, K.G. Bache, C. Raiborg, D. Trambaiolo, S. Wakatsuki, and H. Stenmark. 2005. Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a phosphoinositide-interacting GLUE domain. *J Biol Chem*. 280:19600-6.

Soeda, S., Y. Nakayama, T. Honda, A. Aoki, N. Tamura, K. Abe, Y. Fukumoto, and N. Yamaguchi. 2013. v-Src causes delocalization of Mklp1, Aurora B, and INCENP from the spindle midzone during cytokinesis failure. *Exp Cell Res*. 319:1382-97.

Solan, J.L., M.D. Fry, E.M. TenBroek, and P.D. Lampe. 2003. Connexin43 phosphorylation at S368 is acute during S and G2/M and in response to protein kinase C activation. *J Cell Sci*. 116:2203-11.

Solanas, G., C. Cortina, M. Sevillano, and E. Batlle. 2011. Cleavage of E-cadherin by ADAM10 mediates epithelial cell sorting downstream of EphB signalling. *Nat Cell Biol*. 13:1100-7.

Soskis, M.J., H.Y. Ho, B.L. Bloodgood, M.A. Robichaux, A.N. Malik, B. Ataman, A.A. Rubin, J. Zieg, C. Zhang, K.M. Shokat, N. Sharma, C.W. Cowan, and M.E. Greenberg. 2012. A chemical genetic approach reveals distinct EphB signaling mechanisms during brain development. *Nat Neurosci*. 15:1645-54.

Speliotes, E.K., A. Uren, D. Vaux, and H.R. Horvitz. 2000. The survivin-like C. elegans BIR-1 protein acts with the Aurora-like kinase AIR-2 to affect chromosomes and the spindle midzone. *Mol Cell*. 6:211-23.

Spitzer, C., S. Schellmann, A. Sabovljevic, M. Shahriari, C. Keshavaiah, N. Bechtold, M. Herzog, S. Muller, F.G. Hanisch, and M. Hulskamp. 2006. The Arabidopsis elch mutant reveals functions of an ESCRT component in cytokinesis. *Development*. 133:4679-89.

Srivastava, D., and K.N. Ivey. 2006. Potential of stem-cell-based therapies for heart disease. *Nature*. 441:1097-9.

Steigemann, P., C. Wurzenberger, M.H. Schmitz, M. Held, J. Guizetti, S. Maar, and D.W. Gerlich. 2009. Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization. *Cell*. 136:473-84.

Stein, E., A.A. Lane, D.P. Cerretti, H.O. Schoecklmann, A.D. Schroff, R.L. Van Etten, and T.O. Daniel. 1998. Eph receptors discriminate specific ligand oligomers to determine alternative signaling complexes, attachment, and assembly responses. *Genes Dev*. 12:667-78.

Stein, L.S., J. Boonstra, and R.C. Burghardt. 1992. Reduced cell-cell communication between mitotic and nonmitotic coupled cells. *Exp Cell Res*. 198:1-7.

Steinle, J.J., C.J. Meininger, R. Forough, G. Wu, M.H. Wu, and H.J. Granger. 2002. Eph B4 receptor signaling mediates endothelial cell migration and proliferation via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem*. 277:43830-5.

Stuckmann, I., A. Weigmann, A. Shevchenko, M. Mann, and W.B. Huttner. 2001. Ephrin B1 is expressed on neuroepithelial cells in correlation with neocortical neurogenesis. *J Neurosci*. 21:2726-37.

Subramanian, R., S.C. Ti, L. Tan, S.A. Darst, and T.M. Kapoor. 2013. Marking and measuring single microtubules by PRC1 and kinesin-4. *Cell*. 154:377-90.

Subramanian, R., E.M. Wilson-Kubalek, C.P. Arthur, M.J. Bick, E.A. Campbell, S.A. Darst, R.A. Milligan, and T.M. Kapoor. 2010. Insights into antiparallel microtubule crosslinking by PRC1, a conserved nonmotor microtubule binding protein. *Cell*. 142:433-43.

Suenobu, S., N. Takakura, T. Inada, Y. Yamada, H. Yuasa, X.Q. Zhang, S. Sakano, Y. Oike, and T. Suda. 2002. A role of EphB4 receptor and its ligand, ephrin-B2, in erythropoiesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 293:1124-31.

Sugiyama, N., E. Gucciardo, O. Tatti, M. Varjosalo, M. Hyytiainen, M. Gstaiger, and K. Lehti. 2013. EphA2 cleavage by MT1-MMP triggers single cancer cell invasion via homotypic cell repulsion. *J Cell Biol*. 201:467-84.

Sykes, A.M., and W.B. Huttner. 2013. Prominin-1 (CD133) and the Cell Biology of Neural Progenitors and Their Progeny. *Adv Exp Med Biol*. 777:89-98.

Szibor, M., J. Poling, H. Warnecke, T. Kubin, and T. Braun. 2014. Remodeling and dedifferentiation of adult cardiomyocytes during disease and regeneration. *Cell Mol Life Sci*. 71:1907-16.

Taddei, M.L., M. Parri, A. Angelucci, B. Onnis, F. Bianchini, E. Giannoni, G. Raugei, L. Calorini, N. Rucci, A. Teti, M. Bologna, and P. Chiarugi. 2009. Kinase-dependent and -independent roles of EphA2 in the regulation of prostate cancer invasion and metastasis. *Am J Pathol*. 174:1492-503.

Takahashi, S., T. Takei, H. Koga, H. Takatsu, H.W. Shin, and K. Nakayama. 2011. Distinct roles of Rab11 and Arf6 in the regulation of Rab11-FIP3/arfophilin-1 localization in mitotic cells. *Genes Cells*. 16:938-50.

Tanaka, M., R. Kamata, and R. Sakai. 2005. Phosphorylation of ephrin-B1 via the interaction with claudin following cell-cell contact formation. *Embo J*. 24:3700-11.

Tanaka, M., K. Sasaki, R. Kamata, and R. Sakai. 2007. The C-terminus of ephrin-B1 regulates metalloproteinase secretion and invasion of cancer cells. *J Cell Sci*. 120:2179-89.

Tanaka, T.U., and A. Desai. 2008. Kinetochore-microtubule interactions: the means to the end. *Curr Opin Cell Biol*. 20:53-63.

Telentschak, S., M. Soliwoda, K. Nohroudi, K. Addicks, and F.J. Klinz. 2015. Cytokinesis failure and successful multipolar mitoses drive aneuploidy in glioblastoma cells. *Oncol Rep*. 33:2001-8.

Teng, L., M. Nakada, N. Furuyama, H. Sabit, T. Furuta, Y. Hayashi, T. Takino, Y. Dong, H. Sato, Y. Sai, K. Miyamoto, M.E. Berens, S.G. Zhao, and J. Hamada. 2013. Ligand-dependent EphB1 signaling suppresses glioma invasion and correlates with patient survival. *Neuro Oncol*. 15:1710-20.

Teo, H., D.J. Gill, J. Sun, O. Perisic, D.B. Veprintsev, Y. Vallis, S.D. Emr, and R.L. Williams. 2006. ESCRT-I core and ESCRT-II GLUE domain structures reveal role for GLUE in linking to ESCRT-I and membranes. *Cell*. 125:99-111.

Tessier-Lavigne, M. 1995. Eph receptor tyrosine kinases, axon repulsion, and the development of topographic maps. *Cell*. 82:345-8.
Thelemann, A., F. Petti, G. Griffin, K. Iwata, T. Hunt, T. Settinari, D. Fenyo, N. Gibson, and J.D. Haley. 2005. Phosphotyrosine signaling networks in epidermal growth factor receptor overexpressing squamous carcinoma cells. *Mol Cell Proteomics*. 4:356-76.
Thery, M., V. Racine, A. Pepin, M. Piel, Y. Chen, J.B. Sibarita, and M. Bornens. 2005. The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nat Cell Biol*. 7:947-53.
Thomas, P., S. Harvey, T. Gruner, and M. Fenech. 2008. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutat Res*. 638:37-47.
Thompson, S.L., and D.A. Compton. 2010. Proliferation of aneuploid human cells is limited by a p53-dependent mechanism. *J Cell Biol*. 188:369-81.
Thullberg, M., A. Gad, S. Le Guyader, and S. Stromblad. 2007. Oncogenic H-Ras V12 promotes anchorage-independent cytokinesis in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:20338-43.
Thumkeo, D., S. Watanabe, and S. Narumiya. 2013. Physiological roles of Rho and Rho effectors in mammals. *Eur J Cell Biol*. 92:303-15.
Trivier, E., and T.S. Ganesan. 2002. RYK, a catalytically inactive receptor tyrosine kinase, associates with EphB2 and EphB3 but does not interact with AF-6. *J Biol Chem*. 277:23037-43.
Truitt, L., and A. Freywald. 2011. Dancing with the dead: Eph receptors and their kinase-null partners. *Biochem Cell Biol*. 89:115-29.
Tse, Y.C., A. Piekny, and M. Glotzer. 2011. Anillin promotes astral microtubule-directed cortical myosin polarization. *Mol Biol Cell*. 22:3165-75.
Tuvshintugs, B., T. Sato, R. Enkhtuya, K. Yamashita, and K. Yoshioka. 2014. JSAP1 and JLP are required for ARF6 localization to the midbody in cytokinesis. *Genes Cells*. 19:692-703.
Uehara, R., and G. Goshima. 2010. Functional central spindle assembly requires de novo microtubule generation in the interchromosomal region during anaphase. *J Cell Biol*. 191:259-67.
Uehara, R., R.S. Nozawa, A. Tomioka, S. Petry, R.D. Vale, C. Obuse, and G. Goshima. 2009. The augmin complex plays a critical role in spindle microtubule generation for mitotic progression and cytokinesis in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:6998-7003.
Van Damme, D., D. Inze, and E. Russinova. 2008. Vesicle trafficking during somatic cytokinesis. *Plant Physiol*. 147:1544-52.
van Oostende Triplet, C., M. Jaramillo Garcia, H. Haji Bik, D. Beaudet, and A. Piekny. 2014. Anillin interacts with microtubules and is part of the astral pathway that defines cortical domains. *J Cell Sci*. 127:3699-710.
Vazquez-Novelle, M.D., L. Sansregret, A.E. Dick, C.A. Smith, A.D. McAinsh, D.W. Gerlich, and M. Petronczki. 2014. Cdk1 inactivation terminates mitotic checkpoint surveillance and stabilizes kinetochore attachments in anaphase. *Curr Biol*. 24:638-45.
Vearing, C.J., and M. Lackmann. 2005. "Eph receptor signalling; dimerisation just isn't enough". *Growth Factors*. 23:67-76.
Vera, E., B. Bernardes de Jesus, M. Foronda, J.M. Flores, and M.A. Blasco. 2012. The rate of increase of short telomeres predicts longevity in mammals. *Cell Rep*. 2:732-7.
Vindis, C., D.P. Cerretti, T.O. Daniel, and U. Huynh-Do. 2003. EphB1 recruits c-Src and p52Shc to activate MAPK/ERK and promote chemotaxis. *J Cell Biol*. 162:661-71.

Vogel, B.E., C. Wagner, J.M. Paterson, X. Xu, and J.L. Yanowitz. 2011. An extracellular matrix protein prevents cytokinesis failure and aneuploidy in the C. elegans germline. *Cell Cycle*. 10:1916-20.

Votteler, J., and W.I. Sundquist. 2013. Virus budding and the ESCRT pathway. *Cell Host Microbe*. 14:232-41.

Wagner, M.J., M.M. Stacey, B.A. Liu, and T. Pawson. 2013. Molecular mechanisms of SH2- and PTB-domain-containing proteins in receptor tyrosine kinase signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 5:a008987.

Wahl, S., H. Barth, T. Ciossek, K. Aktories, and B.K. Mueller. 2000. Ephrin-A5 induces collapse of growth cones by activating Rho and Rho kinase. *J Cell Biol*. 149:263-70.

Walther, A., R. Houlston, and I. Tomlinson. 2008. Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Gut*. 57:941-50.

Wang, S.D., P. Rath, B. Lal, J.P. Richard, Y. Li, C.R. Goodwin, J. Laterra, and S. Xia. 2012. EphB2 receptor controls proliferation/migration dichotomy of glioblastoma by interacting with focal adhesion kinase. *Oncogene*. 31:5132-43.

Warner, N., L.E. Wybenga-Groot, and T. Pawson. 2008. Analysis of EphA4 receptor tyrosine kinase substrate specificity using peptide-based arrays. *Febs J*. 275:2561-73.

Watanabe, N., H. Arai, Y. Nishihara, M. Taniguchi, N. Watanabe, T. Hunter, and H. Osada. 2004. M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCFbeta-TrCP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:4419-24.

Watanabe, S., Y. Ando, S. Yasuda, H. Hosoya, N. Watanabe, T. Ishizaki, and S. Narumiya. 2008. mDia2 induces the actin scaffold for the contractile ring and stabilizes its position during cytokinesis in NIH 3T3 cells. *Mol Biol Cell*. 19:2328-38.

Watanabe, S., T. De Zan, T. Ishizaki, and S. Narumiya. 2013. Citron kinase mediates transition from constriction to abscission through its coiled-coil domain. *J Cell Sci*. 126:1773-84.

Wee, P., H. Shi, J. Jiang, Y. Wang, and Z. Wang. 2015. EGF stimulates the activation of EGF receptors and the selective activation of major signaling pathways during mitosis. *Cell Signal*. 27:638-51.

Wegmeyer, H., J. Egea, N. Rabe, H. Gezelius, A. Filosa, A. Enjin, F. Varoqueaux, K. Deininger, F. Schnutgen, N. Brose, R. Klein, K. Kullander, and A. Betz. 2007. EphA4-dependent axon guidance is mediated by the RacGAP alpha2-chimaerin. *Neuron*. 55:756-67.

Werner, M., E. Munro, and M. Glotzer. 2007. Astral signals spatially bias cortical myosin recruitment to break symmetry and promote cytokinesis. *Curr Biol*. 17:1286-97.

Wieland, I., S. Jakubiczka, P. Muschke, M. Cohen, H. Thiele, K.L. Gerlach, R.H. Adams, and P. Wieacker. 2004. Mutations of the ephrin-B1 gene cause craniofrontonasal syndrome. *Am J Hum Genet*. 74:1209-15.

Wiesner, S., L.E. Wybenga-Groot, N. Warner, H. Lin, T. Pawson, J.D. Forman-Kay, and F. Sicheri. 2006. A change in conformational dynamics underlies the activation of Eph receptor tyrosine kinases. *Embo J*. 25:4686-96.

Williams, R.W. 2000. Mapping genes that modulate mouse brain development: a quantitative genetic approach. *Results Probl Cell Differ*. 30:21-49.

Wilson, G.M., A.B. Fielding, G.C. Simon, X. Yu, P.D. Andrews, R.S. Hames, A.M. Frey, A.A. Peden, G.W. Gould, and R. Prekeris. 2005. The FIP3-Rab11 protein complex regulates recycling endosome targeting to the cleavage furrow during late cytokinesis. *Mol Biol Cell*. 16:849-60.

Wimmer-Kleikamp, S.H., P.W. Janes, A. Squire, P.I. Bastiaens, and M. Lackmann. 2004. Recruitment of Eph receptors into signaling clusters does not require ephrin contact. *J Cell Biol*. 164:661-6.

Winklbauer, R. 1986. Cell proliferation in the ectoderm of the Xenopus embryo: development of substratum requirements for cytokinesis. *Dev Biol*. 118:70-81.

Wisniewski, J.R., N. Nagaraj, A. Zougman, F. Gnad, and M. Mann. 2010. Brain phosphoproteome obtained by a FASP-based method reveals plasma membrane protein topology. *J Proteome Res*. 9:3280-9.

Wu, C., R. Qiu, J. Wang, H. Zhang, K. Murai, and Q. Lu. 2009. ZHX2 Interacts with Ephrin-B and regulates neural progenitor maintenance in the developing cerebral cortex. *J Neurosci*. 29:7404-12.

Wu, M.H., A. Rajkovic, K.H. Burns, W. Yan, Y.N. Lin, and M.M. Matzuk. 2003. Sequence and expression of testis-expressed gene 14 (Tex14): a gene encoding a protein kinase preferentially expressed during spermatogenesis. *Gene Expr Patterns*. 3:231-6.

Wybenga-Groot, L.E., B. Baskin, S.H. Ong, J. Tong, T. Pawson, and F. Sicheri. 2001. Structural basis for autoinhibition of the Ephb2 receptor tyrosine kinase by the unphosphorylated juxtamembrane region. *Cell*. 106:745-57.

Xu, K., D. Tzvetkova-Robev, Y. Xu, Y. Goldgur, Y.P. Chan, J.P. Himanen, and D.B. Nikolov. 2013. Insights into Eph receptor tyrosine kinase activation from crystal structures of the EphA4 ectodomain and its complex with ephrin-A5. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:14634-9.

Xu, N.J., and M. Henkemeyer. 2012. Ephrin reverse signaling in axon guidance and synaptogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 23:58-64.

Xu, Q., G. Alldus, N. Holder, and D.G. Wilkinson. 1995. Expression of truncated Sek-1 receptor tyrosine kinase disrupts the segmental restriction of gene expression in the Xenopus and zebrafish hindbrain. *Development*. 121:4005-16.

Xu, Q., G. Alldus, R. Macdonald, D.G. Wilkinson, and N. Holder. 1996. Function of the Eph-related kinase rtk1 in patterning of the zebrafish forebrain. *Nature*. 381:319-22.

Yamashiro, S., G. Totsukawa, Y. Yamakita, Y. Sasaki, P. Madaule, T. Ishizaki, S. Narumiya, and F. Matsumura. 2003. Citron kinase, a Rho-dependent kinase, induces di-phosphorylation of regulatory light chain of myosin II. *Mol Biol Cell*. 14:1745-56.

Yan, Y., Q. Wang, X.L. Yan, Y. Zhang, W. Li, F. Tang, X. Li, and P. Yang. 2015. miR-10a controls glioma migration and invasion through regulating epithelial-mesenchymal transition via EphA8. *FEBS Lett*.

Yang, C.C., H.K. Graves, I.M. Moya, C. Tao, F. Hamaratoglu, A.B. Gladden, and G. Halder. 2015. Differential regulation of the Hippo pathway by adherens junctions and apical-basal cell polarity modules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112:1785-90.

Yang, D., and J.H. Hurley. 2010. Structural role of the Vps4-Vta1 interface in ESCRT-III recycling. *Structure*. 18:976-84.

Yasui, Y., T. Urano, A. Kawajiri, K. Nagata, M. Tatsuka, H. Saya, K. Furukawa, T. Takahashi, I. Izawa, and M. Inagaki. 2004. Autophosphorylation of a newly identified site of Aurora-B is indispensable for cytokinesis. *J Biol Chem*. 279:12997-3003.

Ye, F., and M. Zhang. 2013. Structures and target recognition modes of PDZ domains: recurring themes and emerging pictures. *Biochem J*. 455:1-14.

Yin, Y., Y. Yamashita, H. Noda, T. Okafuji, M.J. Go, and H. Tanaka. 2004. EphA receptor tyrosine kinases interact with co-expressed ephrin-A ligands in cis. *Neurosci Res*. 48:285-96.

Yokote, H., K. Fujita, X. Jing, T. Sawada, S. Liang, L. Yao, X. Yan, Y. Zhang, J. Schlessinger, and K. Sakaguchi. 2005. Trans-activation of EphA4 and FGF receptors mediated by direct interactions between their cytoplasmic domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:18866-71.

Yuce, O., A. Piekny, and M. Glotzer. 2005. An ECT2-centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA. *J Cell Biol*. 170:571-82.

Yumoto, N., S. Wakatsuki, T. Kurisaki, Y. Hara, N. Osumi, J. Frisen, and A. Sehara-Fujisawa. 2008. Meltrin beta/ADAM19 interacting with EphA4 in developing neural cells participates in formation of the neuromuscular junction. *PLoS One*. 3:e3322.

Yurov, Y.B., I.Y. Iourov, S.G. Vorsanova, I.A. Demidova, V.S. Kravetz, A.K. Beresheva, A.D. Kolotii, V.V. Monakchov, N.A. Uranova, V.M. Vostrikov, I.V. Soloviev, and T. Liehr. 2008. The schizophrenia brain exhibits low-level aneuploidy involving chromosome 1. *Schizophr Res*. 98:139-47.

Yurov, Y.B., I.Y. Iourov, S.G. Vorsanova, T. Liehr, A.D. Kolotii, S.I. Kutsev, F. Pellestor, A.K. Beresheva, I.A. Demidova, V.S. Kravets, V.V. Monakhov, and I.V. Soloviev. 2007. Aneuploidy and confined chromosomal mosaicism in the developing human brain. *PLoS One*. 2:e558.

Zack, T.I., S.E. Schumacher, S.L. Carter, A.D. Cherniack, G. Saksena, B. Tabak, M.S. Lawrence, C.Z. Zhang, J. Wala, C.H. Mermel, C. Sougnez, S.B. Gabriel, B. Hernandez, H. Shen, P.W. Laird, G. Getz, M. Meyerson, and R. Beroukhim. 2013. Pan-cancer patterns of somatic copy number alteration. *Nat Genet*. 45:1134-1140.

Zhang, Y., R. Sugiura, Y. Lu, M. Asami, T. Maeda, T. Itoh, T. Takenawa, H. Shuntoh, and T. Kuno. 2000. Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase Its3 and calcineurin Ppb1 coordinately regulate cytokinesis in fission yeast. *J Biol Chem*. 275:35600-6.

Zhao, C., N. Irie, Y. Takada, K. Shimoda, T. Miyamoto, T. Nishiwaki, T. Suda, and K. Matsuo. 2006a. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab*. 4:111-21.

Zhao, W.M., A. Seki, and G. Fang. 2006b. Cep55, a microtubule-bundling protein, associates with centralspindlin to control the midbody integrity and cell abscission during cytokinesis. *Mol Biol Cell*. 17:3881-96.

Zhu, Y.T., H.C. Chen, S.Y. Chen, and S.C. Tseng. 2012. Nuclear p120 catenin unlocks mitotic block of contact-inhibited human corneal endothelial monolayers without disrupting adherent junctions. *J Cell Sci*. 125:3636-48.

Zhuang, Z., B. Yang, M.H. Theus, J.T. Sick, J.R. Bethea, T.J. Sick, and D.J. Liebl. 2010. EphrinBs regulate D-serine synthesis and release in astrocytes. *J Neurosci*. 30:16015-24.

Zimmer, M., A. Palmer, J. Kohler, and R. Klein. 2003. EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nat Cell Biol*. 5:869-78.

Zisch, A.H., M.S. Kalo, L.D. Chong, and E.B. Pasquale. 1998. Complex formation between EphB2 and Src requires phosphorylation of tyrosine 611 in the EphB2 juxtamembrane region. *Oncogene*. 16:2657-70.

Digression

Pourquoi notre cerveau héberge t'il des neurones polyploïdes ?
Voilà la question qui me préoccupe alors que je dois conclure ce mémoire.

Pour tout avouer, je n'avais même pas conscience de la présence de neurones polyploïdes au sein de mon propre cerveau avant de débuter ce travail. J'avais en outre une vision très négative de la polyploïdie - comme une anomalie cellulaire dont l'organisme parfois s'accommode mais souvent pâti.

La polyploïdie cellulaire est un évènement majoritaire chez les plantes et très commun chez certains poissons et les amphibiens. Ce n'est peut-être donc pas si mal ?
C'est pourtant un évènement très rare chez les mammifères et ne concerne à priori qu'une proportion minoritaire des cellules de l'organisme chez l'homme, qui plus est concentrées dans un nombre limité de tissus (cœur, foie, cerveau !!, ...).
Oui mais voilà, Bubulle, mon poisson rouge, lui il est polyploïde. La veine !! Je suis pourtant plus doué qu'un poisson rouge. Moins bon nageur, certes. Mais moi je cours, je parle, je ris, je râle parfois, je mâche ma nourriture (eh oui, moi j'ai des dents…), je sais même conduire, j'adore ça, je cuisine plutôt pas mal et je suis même tombé amoureux… C'est compliqué tout ça, hein Bubulle !! Bon, après tout je n'en sais rien, peut être que Bubulle aussi est amoureux.
Mais les plantes, elles!! Quels avantages elles ont, les plantes, à avoir deux fois plus de copies de leurs gènes que moi?
En fait, apparemment, les plantes ne sont pas des polyploïdes simples. Ce sont des polyploïdes adaptées… Des expériences de néopolyploïdie ont montrées qu'une augmentation du génome produit une période d'instabilité suivie d'une phase d'adaptation et cette phase d'adaptation précède une période de stabilité durant laquelle les cellules redeviennent diploïdes (Comai, Tyagi et al. 2000; Oswald and Nuismer 2011). Car oui, on ne reste peut-être pas polyploïdes éternellement. Et d'après le biologiste Ohno Susumu, nous les humains serions des diploïdes palopolyploïdes, pour dire simple, des anciens polyploïdes (Kasahara 2007). Les plantes et les poissons seraient simplement en retard dans leur évolution et seront peut-être eux aussi diploïdes un jour.

Mais alors quels sont les avantages à être polyploïdes, même temporairement?

1ier avantage : La redondance génétique - Avoir deux copies d'un même gène, c'est par exemple une chance sur deux de pouvoir continuer à transcrire une protéine après un dommage à l'ADN si un seul allèle est endommagé. Avoir quatre copies, c'est donc encore 3 chances. Et huit copies, c'est 7 chances,…ouah la chance ! Avoir deux copies d'un gène c'est aussi pouvoir mobiliser simultanément deux « usines » pour produire les protéines codées par ce gène. Avoir quatre copies, c'est un doublement des capacités industrielles et la possibilité en cas de besoin de fournir à la cellule deux fois plus de protéines dans le même temps de réaction. C'est ce qu'on appelle de la réactivité supplémentaire ! Et la réactivité aussi c'est bien.

2ième avantage : L'hétérosis - Nom barbare pour désigner la résistance accrue, l'augmentation des performances par rapport à un individu diploïde. C'est le secret de la vigueur des hybrides et que partageraient les individus polyploïdes. On ne connait pas les mécanismes de cette vigueur hybride mais c'est un constat, les individus hybrides produisent plus, les plantes hybrides donnent des fleurs plus spectaculaires et résistent mieux aux maladies. D'ailleurs aujourd'hui on en est tous convaincus. Pour preuve, 80 % des surfaces cultivées de blé, au pays de la baguette, sont consacrées à des blés hybrides, tout simplement parce que c'est mieux !!.. On produit même, pour garnir nos assiettes durant les fêtes, des huîtres triploïdes et des saumons tétraploïdes. Il doit y avoir une bonne raison ?

3ième avantage : Etre polyploïde c'est aussi être plus grand, plus gros et plus lourd car il faut bien faire rentrer tous ces avantages. Ca peut servir parfois d'être plus grand, non ?

Et les inconvénients ?

Un peu d'instabilité génétique en plus, et des capacités de division en moins…et d'ailleurs ce n'est peut-être pas que des inconvénients ?

Etre polyploïde au final pour une cellule ce serait donc de la chance en plus, de la réactivité en plus, de la résistance en plus…Cela voudrait dire que mes neurones polyploïdes ont eu plus de chance de résister au stress de la rédaction de ce mémoire et seront plus réactifs pour répondre aux questions du jury….Alors, pourquoi je n'en ai pas plus ?

Comai, L., A. P. Tyagi, et al. (2000). "Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed arabidopsis allotetraploids." Plant Cell **12**(9): 1551-68.
Kasahara, M. (2007). "The 2R hypothesis: an update." Curr Opin Immunol **19**(5): 547-52.
Oswald, B. P. and S. L. Nuismer (2011). "Neopolyploidy and diversification in Heuchera grossulariifolia." Evolution **65**(6): 1667-79.

Au sein d'un organisme les cellules se divisent et assurent la croissance, la différentiation et l'homéostasie des tissus. Des travaux récents proposent qu'elles communiquent activement entre voisines au sein des organes solides pour coordonner leur propre division et la préservation de l'intégrité tissulaire.
Nous proposons que la signalisation Eph-éphrine, acteur de la communication cellulaire locale, participe à cette coordination entre division cellulaire et cohésion du tissu.
Au cours de ma thèse, j'ai démontré dans plusieurs modèles cellulaires que la signalisation Eph-éphrine contrôle la division cellulaire et peut induire des retards dans l'abscission et de la polyploïdie. J'ai prouvé par vidéomicrosocpie que ces défauts d'abscission dépendent du domaine catalytique du récepteur EphB2 et de l'activation de la protéine tyrosine kinase relais c-Src. En cascade, c-Src phosphoryle un régulateur clé de la stabilité du pont intercellulaire, la protéine citron kinase (CitK). J'ai également observé que CitK était anormalement localisé durant la cytocinése en aval de la voie Eph. Par des essais kinase *in vitro*, j'ai exclu une phosphorylation directe de CitK par le récepteur Eph et identifié c-Src comme capable de phosphoryler directement CitK. J'ai identifié les résidus tyrosines de CitK phosphorylés par c-Src, mutés deux d'entre eux et à l'aide d'analyses de sauvetage phénotypique, démontré que ces résidus étaient nécessaires et suffisants pour induire des défauts d'abscission.
J'ai ensuite validé *in vivo* ce rôle original de la voie Eph-éphrine, dans le contexte du développement neuronal chez la souris. Plusieurs membres de la famille des Eph-éphrines sont exprimés dans les progéniteurs neuraux à l'origine des neurones corticaux et des auteurs ont montrés que CitK contrôle la cytocinèse de ces cellules. En utilisant un système Cre-lox, j'ai spécifiquement éteint la signalisation Eph dans ces progéniteurs et observé une modification de la ploïdie neuronale dans ces animaux. J'ai également observé dans les progéniteurs neuraux une co-localisation physiologique de résidus tyrosines phosphorylés et de la protéine CitK, qui adopte un enrichissement apical caractéristique. Ces résultats suggèrent notamment que la signalisation Eph-éphrine pourrait contrôler l'abscission des progéniteurs neuraux via la phosphorylation de CitK.
La cytocinèse est aujourd'hui décrite comme un processus cellulaire autonome orchestré par la machinerie intracellulaire. Les résultats obtenus durant mon doctorat suggèrent que la cytocinèse est également régulée par l'environnement local de la cellule comme j'en ai fait la démonstration avec la signalisation Eph-éphrine. D'autre part, mes travaux suggèrent que la phosphorylation de CitK sert d'interrupteur moléculaire durant la progression à travers la division cellulaire et le contrôle de la ploïdie des neurones.

Cells within an organism successfully divide to ensure growth, differentiation and homeostasie. Recent work suggests that dividing cells actively communicate with neighbours thus spatially and temporally coordinating cell division while maintaining tissue cohesiveness.
We hypothesized that Eph-ephrin signalling, a local cell-cell signalling pathway, could participate in coordinating cell division within a tissue.
Using vertebrate and invertebrate cell culture models I showed that Eph-signalling controls cell division and induces delay in the abscission of nascent daughter cells as well as polyploidy. Using time-lapse imaging I proved that the Eph-mediated abscission failure depends on the catalytic activity of the receptor via the non receptor tyrosine kinase relay molecule c-Src. Downstream of Eph signalling c-Src phosphorylates the protein citron kinase (CitK) a well known regulator of intercellular bridge stability. I also observed that CitK was abnormally localized during cytokinesis when Eph signalling was active. Further, using in vitro kinase assays, I demonstrated that Eph does not directly phosphorylate CitK but that c-Src could do so. In addition, using Mass Spectrometry I mapped all tyrosine residues directly phosphorylated by c-Src. I mutated two of them located in the Rho binding domain of CitK and demonstrated that phosphorylation of those residues are necessary and sufficient to induce cytokinesis failure.
I validated *in vivo* this novel role of Eph-ephrin signalling in a physiological context in the developing mouse neocortex. Members of the Eph/ephrin family are expressed in neural progenitors that give rise to neurons of the cortex upon neurogenic division. Importantly, CitK has been shown by others to control cytokinesis of these progenitor cells. Using the Cre-lox system, I specifically turned off Eph forward signalling in neural progenitor cells and observed an alteration of neuronal ploidy in these mutant animals. Further, I also observed that CitK which adopts a particular apical localisation in neural progenitors physiologically co-localized with phosphorylated tyrosine residues. Altogether, these results suggest that Eph-ephrin signalling controls abscission of neural progenitors by promoting phosphorylation of CitK.
The textbook view of cytokinesis is that it is a cell autonomous event orchestrated by the intracellular machinery. Data obtained during my PhD suggest that cytokinesis is also regulated by local environment, here Eph/ephrin signalling, and that phosphorylation of CitK may represent a molecular switch in the normal progression of cell division and in the control of neuronal ploidy.