



HAL
open science

Rôle des Phosphoinositides dans la division asymétrique

Pierre-Alexis Billa

► **To cite this version:**

Pierre-Alexis Billa. Rôle des Phosphoinositides dans la division asymétrique . Sciences du Vivant [q-bio]. 2016. dumas-01360921

HAL Id: dumas-01360921

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01360921>

Submitted on 6 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.

AGROCAMPUS
OUEST

- CFR Angers
- CFR Rennes



Année universitaire : 2015 – 2016

Spécialité : SCMV

Sciences Cellulaire et Moléculaire du vivant

Spécialisation (et option éventuelle) :

.....

Mémoire de Fin d'Études

- d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

Rôle des Phosphoinositides dans la division asymétrique

Par : Pierre-Alexis BILLA



Soutenu à Rennes

le 13 juin 2016

Devant le jury composé de

- Grégory Eot-Houllier
- Sandrine Lagarrigue
- Frédéric Lecerf
- Laurent Richard-Parpaillon

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord Roland Le Borgne pour m'avoir accepté dans son équipe de recherche « Dynamique et mécanique des épithélia », pour ses précieux conseils et ses remarques durant le stage et la rédaction de mon mémoire.

Je tiens tout particulièrement à remercier Mathieu Pinot, mon tuteur, pour les connaissances apportées et l'intérêt dont il m'a fait part, ainsi que pour la confiance, la patience et l'autonomie qu'il m'a accordé dès mon arrivée dans l'équipe, merci.

Enfin, je remercie toute l'équipe du laboratoire : Émeline Daniel la nouvelle maman, Isabelle Gicquel, Perrine Uhart et Karen Bellec, dont l'accueil et la sympathie ont favorisé mon intégration.

Abstract

Epithelia, present in all metazoans, have a function of mechanical and chemical barrier between the body and the environment. Throughout development and along the adult life, epithelia tissues must grow and/or regenerate to maintain their integrity. This is achieved in part thanks to epithelial cell divisions. Epithelia are mosaic tissues composed of symmetrically dividing cells generating two identical daughter cells that contribute to tissue growth, and asymmetrically dividing cells generating two daughter cells with distinct identities. Asymmetric cell division is an evolutionarily conserved mechanism by which cell fate diversity is generated.

To study this process, we used, as model, the dorsal thorax of *Drosophila melanogaster*. This epithelium is a monolayer composed of two types of cells: epidermal cells and sensory organ precursor (SOPs). SOP is one of the best characterized model of asymmetric cell division in which the mother cell generates two daughters cells pIIa and pIIb whose fate is controlled by the differential activation of the Notch signalling pathway through the segregation of cell fate determinants such as Numb. Numb is an inhibitor of the membrane receptor Notch. During the interphase, Numb is uniformly localized at the plasma membrane, but during the end of prophase Numb localises at the anterior pole of the cell. Unequal partitioning of Numb is regulated by the Par complex localized at the posterior pole of the dividing SOP. Phosphorylation of Numb by atypical protein kinase C (aPKC), a component of the PAR complex, results in the exclusion of Numb from the posterior pole. *in vitro* studies revealed that Numb binds to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate PI(4,5)P₂ via electrostatic interactions. Phosphorylation of Numb by aPKC is predicted to cause the loss of interaction of Numb with PI(4,5)P₂, and therefore could account for the posterior exclusion of Numb. However, the role of PI(4,5)P₂ in the localization of Numb *in vivo* remains unknown, and constitute the aim of this study.

PI(4,5)P₂ are localised at the inner leaflet of the plasma membrane. The phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase (Skittles) and inositol 5-phosphatase (OCRL) regulate the amount of phosphatidylinositol 5-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate respectively, at the membrane. It is difficult to assess the function of the PI(4,5)P₂ (half life: minute time scale) *in vivo* by conventional approaches (RNAi or conventional mutant) because the gene function is impaired for several days prior to the analysis. During this period of time mutant cells can either die if the gene is cell lethal or either accommodate by exploiting alternative metabolic pathways.

Therefore new methodologies need to be used to assess the function of PI(4,5)P₂ *in vivo*. Optogenetic combines optic manipulation and genetic and is based on the reversible dimerization of two plants proteins: CIBN (Cryptochrome Interacting Basic-helix-loop-helix (n-terminal part)) and CRY2 (Cryptochrome 2). Under excitation at 488nm, CRY2 and CIBN fuse in few seconds and go back at the initial state after few minutes in the dark. In this project, we used the CIBN probe anchored at the plasma membrane and fused to the GFP (Green Fluorescent Protein) and the CRY2 probe fused with the inositol 5-phosphatase (OCRL) and mcherry. These probes were recently generated to test the role of PI(4,5)P₂ during the embryogenesis of *Drosophila*. The project consisted in defining and adjusting experimental conditions to control in space and time the relocalization of OCRL at the plasma membrane to reduce the level of PI(4,5)P₂. The biological aim was to test *in vivo* the role of PI(4,5)P₂ for the asymmetric localization of Numb during SOP division.

First, using the UAS-GAL4 system we expressed each genetic construction under the control of two GAL4 drivers: *pannier*-GAL4 (*pnr*-GAL4), that permits an expression on the central part of the notum and *neuralized*-P^{GAL4} (*neur*-P^{GAL4}) that drives the expression solely to the SOPs. Under the *neur*-P^{GAL4} driver, the dimerization of GFP::CIBN and mcherry::CRY2-OCRL didn't occur at the stage of SOP division, suggesting an expression threshold problem. With the *pnr*-GAL4 driver, we observed a relocation of mcherry::CRY2-OCRL few seconds after 488nm stimulation and totally reversible after 20 minutes without light stimulation. In a second part, we looked for the optimization of optical manipulation settings (software's module, laser power) in order to better control in space and time the relocation of mcherry::CRY2-OCRL. Finally, to test the effect of optogenetic probe GFP::CIBN and mcherry::CRY2-OCRL on the dorsal thorax of *Drosophila melanogaster*, we exposed *Drosophila* to three light conditions: cycle day and night, 24h/24 under light exposure and 24h/24 in the dark. We observed, for each light condition, the formation of GFP::CIBN mcherry::CRY2-OCRL clusters. The formation and the reversibility of these clusters depend on the development conditions. However, none of the conditions caused a detectable adult Notch phenotype expected for a defective Numb localization.

In conclusion, we defined in this study experimental conditions to relocalize, in a time and space controlled manner, the inositol 5-phosphatase OCRL at the plasma membrane. We highlighted a second-magnitude re-localization and a minute magnitude reversibility that depends on the spatial activation and the laser power excitation. This study paved the way to investigate the precise effects on PI(4,5)P₂ level and the *in-vivo* link between PI(4,5)P₂, Numb anchoring and cell fate acquisition.

Liste des abréviations

APF : After Pupae Formation

aPKC : atypical Protein Kinase C

CIBN : Cryptochrome Interacting Basic-helix-loop-helix (domaine amino terminal)

CRY2 : Cryptochrome 2

Cyo : Curly-O (ailes recourbées)

DSL : Delta, Serrate, LAG-2

GFP : green fluorescent protein

Hu : Humeral (poils supplémentaires sur le prothorax)

Neur : Neuralized

OCRL : Oculocerebrorenal Syndrome of Lowe

PH : Pleckstrin Homology

PHR : N-terminal photolyase homology

PI(4,5)P₂ : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

pmGFP : plasma membrane GFP

Pnr : Pannier

Sb : Stubble (soies courtes et épaisses)

Ser : Serrate (encoche dans l'aile)

SOP : Sensory Organ Precursor

Tb : Tubby (petites pupes)

UAS : Upstream Activation Sequence

Liste des illustrations

Figure 1 : Représentation schématique de l'épithélia du thorax dorsal de drosophile, un tissu hétérogène et division asymétrique des SOPs	5
Figure 2 : Modèle d'expression des sondes optogénétiques sous la dépendance du système UAS-GAL4.....	17
Figure 3 : Expression des sondes optogénétiques sous la dépendance des pilotes <i>pnr</i> -GAL4 et <i>neur</i> -P ^{GAL4}	18
Figure 4 : Optogénétique sous la dépendance du pilote	19
Figure 6 : Contrôle spatial de la zone d'activation par la méthode « zoom in ».	21
Figure 7 : Contrôle spatial de la zone d'activation par la méthode de sélection d'une zone d'intérêt.....	22
Figure 8 : Test des différentes conditions d'éclairement.....	23

Liste des tableaux

Tableau 1 : Génotypes et croisements	10
Tableau 2 : Nombre d'individus pour chaque génotype et chaque condition d'éclairement ...	24

Sommaire

1. Introduction	1
2. Matériels et méthodes.....	6
2.1. Lignées de drosophiles.....	6
2.2. Croisements	7
2.3. Gestion des stocks et croisements.....	7
2.4. Prélèvements et dissections	7
2.5. Observations	8
2.6. Analyses Quantitatives	8
3. Résultats	11
3.1. CIBN::pmGFP et mcherry::CRY2-OCRL, deux constructions formant un complexe à certaines longueurs d'onde - principe de l'optogénétique	11
3.2. <i>pnr</i> -GAL4 et <i>neur</i> -P ^{GAL4} , des pilotes permettant une expression ciblée des constructions optogénétiques.....	11
3.3. Dissection et observation sans déclencher une formation du complexe CIBN-CRY2 non souhaitée	12
3.4. <i>neur</i> -P ^{GAL4} , un pilote ne permettant une délocalisation qu'au stade pupal tardif.....	13
3.5. <i>pnr</i> -GAL4, un promoteur plus fort permettant une délocalisation rapide et une réversibilité au bout de 15 min dans les pupes à 16h APF	13
3.6. Une précision spatiale correcte effectuée par sélection de zone d'intérêt à 2% de puissance laser 488nm	15
3.7. Agrégation des complexes CIBN-CRY2.....	15
3.8. La formation des complexes CIBN-CRY2 n'induisant pas de phénotype	16
4. Discussion	25
4.1. Expression sous contrôle des pilotes <i>pnr</i> -GAL4 et <i>neur</i> -P ^{GAL4}	25
4.2. Précision spatiale d'activation	26
4.3. Conditions d'éclairement : formation des agrégats membranaires.....	26
4.4. formation des complexes CIBN-CRY2 à la membrane plasmique et déplétion des PI(4,5)P ₂	27
5. Références bibliographiques	29

1. Introduction

Un épithélium est un tissu dont les cellules sont étroitement juxtaposées et solidaires, disposées en une ou plusieurs couches et formant un revêtement externe (en surface de la peau), ou tapissant la face interne des organes. Les épithélia, présents chez tous les métazoaires, ont ainsi une fonction de barrière mécanique et chimique entre l'intérieur et l'extérieur. Au cours du développement les cellules composant ces épithélia doivent se diviser pour contribuer à la croissance tissulaire et permettre aux épithélia de conserver leur intégrité. Les épithélia sont des tissus mosaïques composés de cellules aux identités distinctes communiquant entre elles. Cette communication s'effectue par des interfaces de signalisation ligand-récepteur qui s'appuient sur les contacts adhésifs.

L'intégrité et l'hétérogénéité du tissu sont maintenues par deux types de division: la division symétrique et asymétrique. La première correspond à toute division d'une cellule mère en deux cellules filles identiques, ce qui permet de contribuer par exemple à la croissance du tissu. La division asymétrique est un mécanisme conservé par lequel la diversité de destin cellulaire est générée au cours du développement (Horvitz and Herskowitz 1992). Cette dernière est contrôlée par une ségrégation asymétrique de protéines exerçant un rôle de déterminants cellulaires (Jan and Jan 1998), qui contrôlent l'activité de certaines voies de signalisation telle que la voie Notch.

La voie de signalisation Notch est une voie de communication intercellulaire déclenchée par l'interaction du ligand de la famille DSL (Delta/Serrate/LAG-2) avec le récepteur Notch. La voie Notch exerce de nombreux rôles au sein des tissus comme la survie cellulaire, la prolifération ou la différenciation. En cas de dérégulation, elle est aussi associée à de nombreux processus tumoraux comme le cancer du poumon (Westhoff et al. 2009). Dans le cas de l'acquisition de l'identité cellulaire, la protéine Notch, un récepteur membranaire, interagit avec son ligand, présent à la membrane plasmique d'une cellule voisine. Cette interaction entraîne un clivage de la protéine Notch et la partie intracellulaire ainsi générée peut être transloquée dans le noyau où elle agit comme régulateur de l'expression de gènes cibles tel que Suppresseur de « Hairless» (Le Borgne et al., 2005).

Le thorax de drosophile (*notum*) est un épithélium monocouche composé de cellules épithéliales et d'organes mécanosensoriels provenant de cellules précurseurs SOPs (Sensory Organ Precursor) (Figures 1A et B). La voie Delta-Notch régule deux événements distincts dans ce tissu. Tout d'abord, la sélection de la SOP au sein du groupe proneural, composé d'une vingtaine de cellules équipotentes, est le résultat d'une compétition, appelée inhibition latérale, remportée par la cellule qui exprime le plus le ligand Delta et active ainsi le plus le récepteur Notch chez ses voisines (Jafar-Nejad et al. 2003). Une fois sélectionnée, la SOP subit une série de quatre divisions asymétriques pour produire les cinq cellules qui composent l'organe mécanosensoriel adulte (Figure 1C). Lors de la division des SOPs, deux déterminants d'identité cellulaire, Numb et Neuralized (Neur), ségrègent asymétriquement dans la cellule fille antérieure (Rhyu, Jan, and Jan 1994; Schweisguth 2015). Dans cette cellule, Numb régule la localisation du récepteur Notch pour l'inhiber, tandis que l'E3 ligase Neur active le ligand Delta. Cette cellule devient ainsi la cellule émettrice du signal et adopte l'identité pIIb. Dans la cellule postérieure, Notch peut être activé *en trans* par le ligand Delta de la cellule pIIb, la cellule postérieure devient donc réceptrice du signal et adopte l'identité pIIa (Le Borgne 2006) (Figure 1D).

Durant l'interphase Numb est localisé uniformément à la membrane plasmique et en fin de prophase Numb forme un croissant au pôle antérieur de la SOP (Rhyu, Jan, and Jan 1994; Bailey and Prehoda 2015). La localisation de Numb est régulée par le complexe de polarité Par. Durant la prophase, le complexe Par localise préférentiellement au pôle opposé. Ce complexe est composé de plusieurs protéines, dont la Protéine Kinase C atypique (aPKC) qui a Numb comme substrat. La phosphorylation de Numb par l'aPKC entraîne sa délocalisation. Une étude récente a montré, qu'*in vitro*, Numb a une affinité pour les phospholipides Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) (Bailey and Prehoda 2015). Celui-ci interagit avec les PI(4,5)P₂ par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques. La phosphorylation par l'aPKC entraîne une perte de cette interaction, empêchant ainsi le recrutement de Numb au cortex postérieur. Cette exclusion de Numb au pôle postérieur conduirait ainsi à la formation du croissant de Numb au pôle antérieur.

Les PI(4,5)P₂ sont majoritairement localisés sur la surface interne de la membrane plasmique (van Meer, Voelker, and Feigenson 2008). La présence de la phosphatidylinositol-5-phosphatase et de la phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase (respectivement OCRL et Skittles chez la drosophile) permet un équilibre entre phosphatidylinositol 4-phosphate (PI(4)P) et phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) au niveau de la membrane. Il a

été montré qu'une inactivation de l'enzyme Skittles entraîne une perte de la localisation asymétrique du déterminant de polarité Par (Claret et al. 2014). De même une inactivation de OCRL entraîne une instabilité dans la division cellulaire (Nández et al. 2014), montrant l'importance des PI(4,5)P₂ dans la division asymétrique. Ces deux études utilisent des mutants nuls des enzymes Skittles et OCRL (absence totale des enzymes), c'est à dire des méthodes non réversibles et sans contrôle spatiotemporel de celles-ci, ce qui peut affecter d'autres voies de signalisation.

L'utilisation de méthodes non invasives et réversibles avec un très bon contrôle spatiotemporel est importante pour l'étude des divisions asymétriques et de la voie Notch qui en découle ; cela afin de pouvoir effectuer l'expérimentation sur la fenêtre temporelle des divisions des cellules étudiées. L'idée est de pouvoir moduler la composition membranaire en PI(4,5)P₂ au moment des divisions cellulaires où le déterminant Numb se localise asymétriquement. L'optogénétique est une méthode alliant génétique et optique qui permet d'impacter de manière réversible la fonction du gène d'intérêt dans les cellules étudiées (Deisseroth 2011). Précisément, la méthode implique une manipulation génétique non invasive et réversible des fonctions cellulaires, ce qui permet aux cellules d'exprimer des protéines sensibles à la lumière. Ces protéines telles que CIBN (Cryptochrome Interacting Basic-helix-loop-helix (domaine amino terminal)) et CRY2 (Cryptochrome 2), issues de la plante *Arabidopsis thaliana*, interagissent entre elles en quelques secondes si elles sont exposées à une stimulation optique comprise entre 488nm et 514nm et se dissocient après quelques minutes sans stimulation (Taslimi et al. 2014). Cette méthode optogénétique a été appliquée, récemment, dans l'étude du rôle des PI(4,5)P₂ dans la contraction cellulaire lors de l'embryogénèse de la drosophile, en forçant la localisation de OCRL à la membrane plasmique qui force ainsi un déséquilibre en PI(4,5)P₂ (Guglielmi et al. 2015).

L'importance des phosphatidyl-inositol phosphate PI(4,5)P₂ dans la division asymétrique est encore inconnue à l'échelle de l'*in vivo*. La drosophile est un modèle particulièrement connu dans l'étude des divisions asymétriques et leur lien avec la voie de signalisation Notch. De plus l'imagerie *in vivo* est facilement applicable au stade pupal de ce modèle. L'objectif de ce stage est de pouvoir étudier le rôle des phosphatidyl-inositol phosphate dans la division asymétrique des SOPs via la mise en place de la méthode optogénétique.

Dans cette étude, nous développerons la méthode optogénétique afin d'observer *in vivo* le rôle des PI(4,5)P₂ dans l'ancrage cortical de Numb durant la division asymétrique des SOP. Pour ce faire, nous testerons sur le notum les constructions optogénétiques générées pour une étude précédente (Guglielmi et al. 2015; Idevall-Hagren et al. 2012). CIBN est ancré à la membrane et est couplé à un fluorochrome GFP ; CRY2 est couplé à la phosphatase OCRL et au fluorochrome mCherry. Nous chercherons à relocaliser OCRL à la membrane plasmique pour réduire localement la quantité de PI(4,5)P₂ et ainsi à étudier l'impact sur la localisation de Numb et le destin cellulaire.

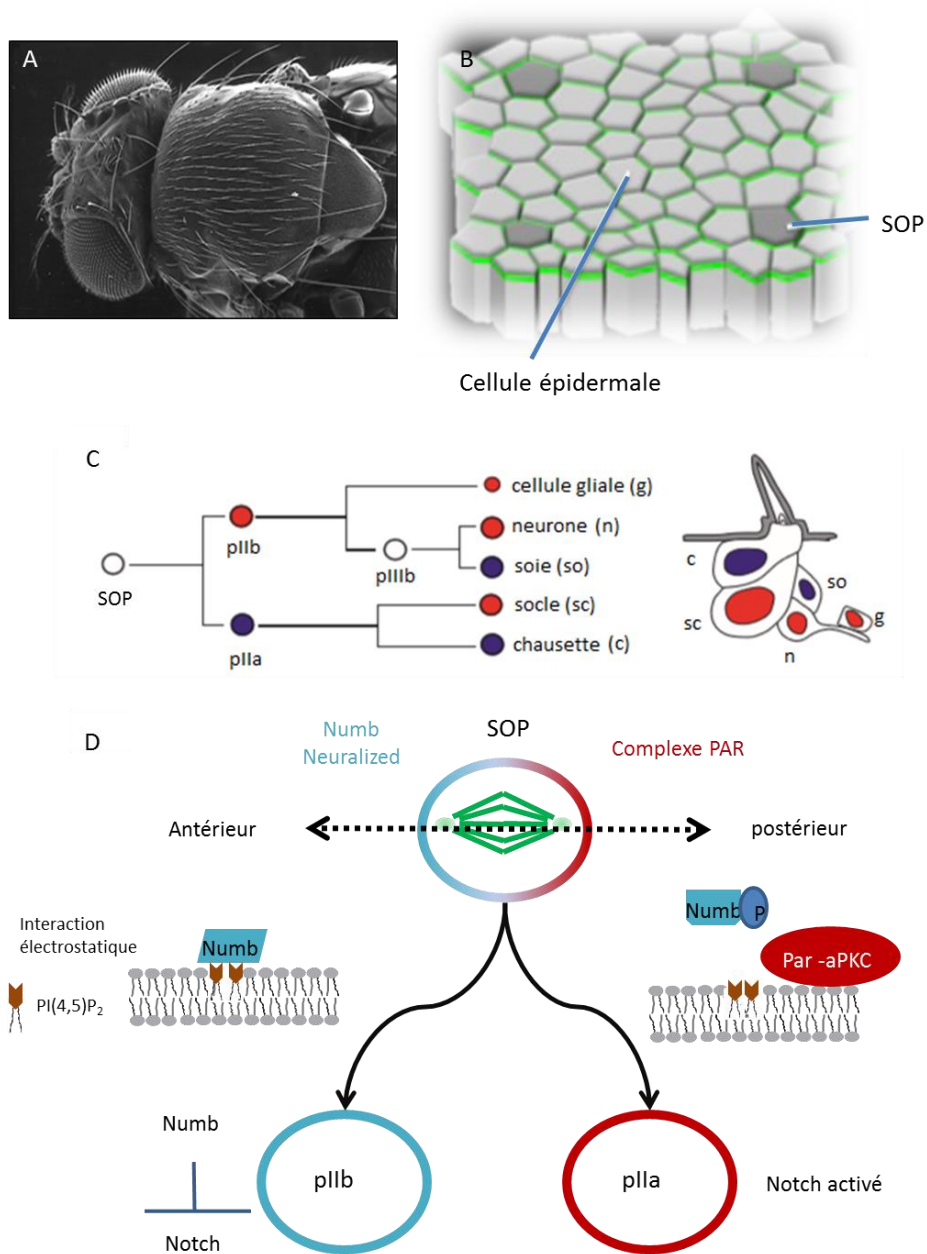


Figure 1 : Représentation schématique de l'épithélia du thorax dorsal de drosophile, un tissu hétérogène et division asymétrique des SOPs

(A) Photographie de la tête et du dos d'une drosophile adulte par microscopie électronique à balayage. Les organes mécanosensoriels (petites soies sensorielles alignées en rangées le long de l'axe antéro postérieur) sont présents sur le thorax dorsal de drosophile adulte. (B) Représentation schématique d'un épithélia de drosophile avec les cellules épidermales et les SOPs. (C) Schéma des divisions successives de la SOP jusqu'à l'organe sensoriel final (Gho, Bellaïche, and Schweisguth 1999). (D) Schéma de la première division de la SOP avec la répartition asymétrique des déterminants cellulaires Numb et Neur médiée par la localisation asymétrique du complexe de polarité Par, cela amenant à la formation de deux cellules distinctes pIIa et pIIb.

2. Matériels et méthodes

2.1. Lignées de drosophiles

Toutes les lignées utilisées et présentées ci-après sont stabilisées par des chromosomes balanceurs afin de pérenniser le génotype d'un stock au cours des générations ; cela est dû au fait que les chromosomes balanceurs présentent de larges remaniements/délétions chromosomiques entraînant une létalité à l'état homozygote.

w; UASp>CIBN::pmGFP/CyO ; Sb/TM3, Ser a été générée et gracieusement donnée par l'équipe du Dr. De Renzis (Guglielmi et al. 2015). La partie amino terminale de la protéine CIB1 est fusionnée à un fluorochrome GFP qui est lui-même couplé à une queue CAAX (une cystéine, deux acides aminés aliphatiques et un acide aminé quelconque) qui promeut l'ancrage à la membrane plasmique.

w; +/+ ; UASp>mcherry::CRY2-OCRL/TM3, Sb a été générée et gracieusement donnée par l'équipe du Dr. De Renzis (Guglielmi et al. 2015). Le domaine PHR en N-terminal de la protéine CRY2 est couplé à l'inositol polyphosphate 5-phosphatase (OCRL) de *Drosophila melanogaster*. La partie carboxy-terminale est couplée au fluorochrome mcherry, qui est séparé de CRY2 par le polypeptide GAGA utilisé comme espaceur flexible.

w ; +/+ ; pnr-GAL4/TM6, Tb, Hu et *w; +/+ ; neur-P^{GAL4}/TM6, Tb, Hu* sont deux promoteurs GAL4 permettant une expression des gènes placés sous contrôle des promoteurs UAS. *pannier-GAL4 (pnr-GAL4)* et *neuralized-P^{GAL4} (neur-P^{GAL4})* permettent, respectivement, une expression des transgènes dans toutes les cellules du notum de la drosophile ou spécifiquement dans les SOPs.

w ; UASp>CIBN::pmGFP/CyO ; pnr-GAL4/TM3, ser est un stock issu de croisements précédemment effectués par l'équipe.

w ; [Numb15; neur-P^{GAL4} nanobody-cry2-cherry]/ SM5-TM6, Tb est un stock possédant les chromosomes balanceurs fusionnés entre eux, permettant d'accélérer l'établissement des croisements suivants.

2.2. Croisements

Les croisements sont effectués à partir de mâles et de femelles vierges des génotypes à croiser afin d'obtenir des lignées hétérozygotes. Les croisements effectués au cours de cette étude sont répertoriés dans le tableau 1.

2.3. Gestion des stocks et croisements

Les stocks de mouches ou les croisements sont placés dans des tubes contenant un milieu nutritif (500g de levure, 500g de maïs, 45g d'agar et un antifongique pour 6L d'eau) et élevés à 25°C.

Les tubes contenant les croisements amenant aux expérimentations d'optogénétique sont conservés dans trois types de conditions de luminosité : cycle jour/nuit classique, 24h/24 à la lumière ou 24h/24 à l'obscurité totale.

2.4. Prélèvements et dissections

Les pupes du génotype *pnr-GAL4* ou *neur-P^{GAL4}*, ainsi que *CIBN::pmGFP* et/ou *mcherry::CRY2-OCRL* ont des glandes salivaires qui fluorescent sous les longueurs d'onde des fluorochromes. Grâce à ce critère, les pupes sont sélectionnées au moment de la transition larve-pupe sous lampe fluo. Elles sont ensuite disséquées et observées à 16h APF (after pupae formation, après formation de la pupa) à 25°C. Les expérimentations présentées dans le paragraphe 3.4 sont issues de pupes disséquées 24h APF.

Le protocole de dissection est adapté du protocole de Gho, Bellaïche, et Schweisguth (1999) et s'effectue sous loupe binoculaire type LEICA MZ6 (grossissement 10). Les pupes sont placées sur une lame avec un ruban de scotch double face, celles-ci sont ensuite disséquées. Pour ce faire, la case pupale est ôtée au niveau de la tête puis délicatement coupée le long de l'axe antéro-postérieur afin de dégager le notum de la larve. Des lamelles (18x18) sont fixées de part et d'autre (5 en postérieur et 4 en antérieur) pour placer une lamelle (24x18), recouverte d'un fin film d'huile Voltalef 10S (huile permettant les échanges gazeux), sur la pupa afin de former un ménisque sans écraser celle-ci. Cela permet de limiter au maximum la diffraction de la lumière et d'obtenir la meilleure résolution possible durant l'observation.

Pour les pupes devant être conservées 24h/24 dans le noir, la dissection s'effectue dans une pièce noire munie d'une lampe avec un filtre jaune (~561nm) afin de filtrer toutes les longueurs d'onde inférieures à 561nm pouvant entraîner une activation du complexe optogénétique.

2.5. Observations

Les pupes sont observées sous un microscope confocal LEICA DMI 6000 CS (statif inversé), possédant un laser argon (488nm), une diode laser (561nm) et un laser pulsé Mai Tai HP Ti (700nm à 1020nm), sous objectif à immersion à huile 63x avec ouverture numérique de 1,43.

L'acquisition des films s'effectue via le logiciel d'acquisition LAS AF en résolution 512x512 et 400Hz. Les fluorescences sont détectées respectivement par des récepteurs PMT (photomultiplicateur) pour la GFP et un détecteur hybride pour la fluorescence de mcherry.

L'activation de l'optogénétique ou l'observation de la construction CIBN::pmGFP s'effectue sous le laser 488nm aux puissances 2%, 5% et 10 %. L'observation de la fluorescence issue de la construction mcherry::CRY2-OCRL se fait sous laser 561nm à 2%, cette longueur d'onde n'entraînant aucune activation optogénétique.

Le module FRAP normalement utilisé pour les expériences de photoblanchiment d'une région d'intérêt sert ici à activer une région d'intérêt. Deux options du module sont utilisées, le grossissement sur une zone (module 'zoom-in') ou la sélection de la zone d'intérêt (ROI : region of interest). Le principe du zoom in est de sélectionner la zone ciblée et le logiciel va effectuer un grossissement électronique sur cette zone tout en enclenchant le laser désiré (ici le 488nm). La deuxième méthode fait en sorte que le laser ne s'allume que dans la zone ciblée sans que le logiciel effectue un grossissement sur celle-ci.

2.6. Analyses Quantitatives

Les images issues du microscope sont analysées avec le logiciel imageJ. L'analyse de la réversibilité du complexe CIBN-CRY2 s'effectue via des kymographes et des profils de fluorescence. Les kymographes sont effectués à partir des images brutes en traçant un trait sur la zone d'intérêt et en utilisant la fonction kymographe multiple du logiciel, cela permet de

représenter un profil d'intensité au cours du temps correspondant à la zone sélectionnée. Les profils d'intensité de fluorescence sont effectués sur les images brutes ou les kymographes en traçant un trait sur la zone d'intérêt au temps choisi.

Le comptage des particules s'effectue à partir d'une projection verticale sur $3,5\mu\text{m}$ des points d'intensité maximale. Un seuil de fluorescence est ensuite défini sur les projections afin de segmenter ces différents points pour effectuer un comptage sur l'image. L'utilisation de la fonction d'analyse de particules permet de compter ces points. Ce nombre de points est ensuite normalisé par rapport à la surface de comptage.

Génotype vierge	Génotype mâle	Descendances analysées
<i>w</i> ; <i>UASp>CIBN::pmGFP/CyO</i> ; <i>pnr-GAL4/TM3, ser</i>	<i>w</i> ; +/+ ; <i>UASp>mcherry::CRY2-OCRL/TM3, Sb</i>	<i>w</i> ; <i>UASp>CIBN::pmGFP/+</i> ; <i>UASp>mcherry::CRY2-OCRL/ pnr-GAL4</i> <i>w</i> ; +/ <i>cyo</i> ; <i>UASp>mcherry::CRY2-OCRL/ pnr-GAL4</i>
<i>w</i> ; +/+; <i>neur-P^{GAL4}TM6, Tb, Hu</i>	<i>w</i> ; +/+ ; <i>UASp>mcherry::CRY2-OCRL/TM3, Sb</i>	<i>w</i> ; +/+ ; <i>UASp>mcherry::CRY2-OCRL/ neur-P^{GAL4}</i>
<i>w</i> ; +/+; <i>neur-P^{GAL4}/TM6, Tb, Hu</i>	<i>w</i> ; <i>UASp>CIBN::pmGFP/CyO</i> ; <i>Sb/TM3, Ser</i>	<i>w</i> ; <i>UASp>CIBN::pmGFP/+</i> ; <i>neur-P^{GAL4}/TM3, Ser</i>
<i>w</i> ; +/+ ; <i>UASp>mcherry::CRY2-OCRL/TM3, Sb</i>	<i>w</i> ; <i>UASp>CIBN::pmGFP/+</i> ; <i>neur-P^{GAL4}/TM3, Ser</i>	<i>w</i> ; <i>UASp>CIBN::pmGFP/+</i> ; <i>neur-P^{GAL4}/</i> <i>UASp>mcherry::CRY2-OCRL</i>
<i>W</i> ; [<i>Numb15; p72 nano cry2 cherry</i>]/ <i>SM5-TM6, Tb</i>	<i>w</i> ; <i>UASp>CIBN::pmGFP/+</i> ; <i>neur-P^{GAL4}/TM3, Ser</i>	<i>W</i> ; [<i>UASp>CIBN::pmGFP; neur-P^{GAL4}</i>]/ <i>SM5-TM6, Tb</i>
<i>w</i> ; +/+ ; <i>UASp>mcherry::CRY2-OCRL/TM3, Sb</i>	<i>W</i> ; [<i>UASp>CIBN::pmGFP; neur-P^{GAL4}</i>]/ <i>SM5-TM6, Tb</i>	<i>w</i> ; <i>UASp>CIBN::pmGFP/+</i> ; <i>neur-P^{GAL4}/</i> <i>UASp>mcherry::CRY2-OCRL</i>

Tableau 1 : Génotypes et croisements

3. Résultats

3.1. CIBN::pmGFP et mcherry::CRY2-OCRL, deux constructions formant un complexe à certaines longueurs d'onde - principe de l'optogénétique

L'optogénétique a pour but de permettre la délocalisation de certains composés cellulaires à un endroit ciblé, et ce de manière réversible grâce aux protéines photosensibles telles que CIBN et CRY2, deux protéines issues d'*Arabidopsis thaliana*. CIBN et CRY2 sont respectivement fusionnées à deux fluorochromes : la GFP et la mcherry, ce qui permet le suivi des constructions. Après excitation à leurs longueurs d'onde respectives (488nm et 568nm), ces deux protéines émettent respectivement à 510nm et 610nm. De plus la GFP est ici couplée à une queue CAAX en carboxy-terminal. Le motif CAAX correspond à l'enchaînement cystéine, deux acides aminés aliphatiques et un acide aminé quelconque, cela permet de greffer à la cystéine un acide gras longue chaîne qui peut s'insérer dans la membrane plasmique. Ainsi la construction CIBN::pmGFP est ancrée à la membrane plasmique des cellules l'exprimant. La protéine CRY2 est quant à elle couplée à l'inositol polyphosphate 5-phosphatase (OCRL), qui catalyse la réaction de passage entre le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) et le phosphatidylinositol 4-phosphate (PI(4)P).

L'expression dans une même cellule de ces deux constructions permet normalement de forcer la localisation de l'inositol 5-phosphatase à la membrane plasmique quand la cellule est exposée à une longueur d'onde inférieure à 651nm. Cela conduit, en théorie, à forcer la déplétion en phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate de la membrane plasmique (Figure 2A).

3.2. *pnr*-GAL4 et *neur*-P^{GAL4}, des pilotes permettant une expression ciblée des constructions optogénétiques.

Génétiquement l'expression des constructions CIBN::pmGFP et mcherry::CRY2-OCRL sont sous la dépendance du promoteur galactose noté UAS (Upstream Activating Sequence) dans les génotypes. Par croisement, il est possible d'apporter différents pilotes GAL4 afin de restreindre l'expression à certaines zones, ou certains types cellulaires (Figures 2B et C).

Dans les pupes *w; UASp>CIBN::pmGFP/CyO ; pnr-GAL4/TM3, ser* et *w; +/-cyo ; UASp>mcherry::CRY2-OCRL/ pnr-GAL4*, l'expression est contrôlée par le pilote *pnr-GAL4*. Celui-ci permet une expression des constructions dans toutes les cellules épithéliales de la portion centrale du notum au stade pupal (Figure 2D). L'analyse par microscopie confocale des pupes permet d'observer que le profil d'expression de *CIBN::pmGFP* est uniforme alors que *mcherry::CRY2-OCRL* présente des discontinuités visibles par des zones sans fluorescence sur les individus (Figures 3A et B). La mesure de l'intensité des fluorescences de ces deux génotypes permet d'observer, pour *CIBN::pmGFP*, des pics d'intensité correspondant aux membranes plasmiques suggérant que l'ancrage est opérationnel (Figures 3A' et A''). L'intensité de *mcherry::CRY2-OCRL* est, quant à lui, homogène suggérant que cette construction se trouve bien dans le cytoplasme (Figures 3B' et B'').

Dans les pupes *w; +/+ ; UASp>mcherry::CRY2-OCRL/ neur-P^{GAL4}* et *w; UASp>CIBN::pmGFP/+; neur-P^{GAL4}/TM3, Ser*, le pilote *neur-P^{GAL4}* permet une expression des constructions spécifiquement dans les organes sensoriels de la drosophile (Figure 2D). L'analyse par microscopie confocale permet de constater une expression uniforme des constructions à tous les organes sensoriels (Figures 3C, C', D et D'). Là encore, l'ancrage de *CIBN* est fonctionnel car celui-ci ne se retrouve qu'à la membrane plasmique et *CRY2* ne s'exprime que dans le cytoplasme (Figures 3 C'' et D'').

3.3. Dissection et observation sans déclencher une formation du complexe CIBN-CRY2 non souhaitée

Une difficulté expérimentale majeure de la manipulation par optogénétique réside dans le fait que lors des observations des pupes possédant les constructions optogénétiques aucun photon parasite, c'est-à-dire autre que ceux provenant de l'excitation lumineuse désirée, ne doit les atteindre. Toutes les sources lumineuses (écran PC, LED des systèmes hardware contrôlant le microscope, entrebâillement de porte) sont donc abolies durant l'expérimentation. Ainsi, afin de pouvoir continuer à contrôler le microscope, tout en ayant les écrans éteints, nous avons utilisé le logiciel de contrôle à distance Teamviewer®.

De plus, les pupes, ne devant pas être exposées à la lumière avant observation, sont disséquées dans une pièce noire en utilisant pour seule source de lumière, une lumière jaune. Celle-ci est obtenue grâce à un filtre ne laissant passer que les longueurs d'onde supérieures à 561nm.

3.4. *neur-P^{GAL4}*, un pilote ne permettant une délocalisation qu'au stade pupal tardif

Les pupes *w; UASp>CIBN::pmGFP /+ ; UASp>mcherry::CRY2-OCRL/neur-P^{GAL4}* sont sélectionnées au stade larvaire via la double fluorescence (verte et rouge) de leurs glandes salivaires. Celles-ci sont alors observées par microscopie afin d'étudier l'effet des constructions optogénétiques sur la division asymétrique. Dans le cas de pupes tardives (~24h APF), quand l'organe sensoriel est formé, une exposition à une longueur d'onde de 488nm permet une délocalisation de la construction *mcherry::CRY2-OCRL* du cytoplasme à la membrane plasmique visible juste après l'extinction, soit à $t=0$ minute. Visuellement, à $t=10$ minutes il est encore possible de distinguer la membrane ; à partir de $t=15$ minutes la membrane n'est plus discernable. Cela suggère que cette délocalisation est réversible au cours du temps lorsqu'il n'y a plus d'exposition au laser 488nm (Figures 4A à A'''). L'analyse par kymographe permet de quantifier ces observations. A $t=0$ minute, il est possible d'observer deux pics de 1 micron de large à mi-hauteur, cela correspond à la membrane plasmique de la cellule. A $t=10$ minutes et à $t=15$ minutes ces deux pics ont disparu, ce qui suggère une dissociation du complexe CIBN-CRY2 et un retour de la construction *mcherry::CRY2-OCRL* dans le cytoplasme (Figures 4B et C).

Le fait que sous une stimulation au laser 488nm, la construction *mcherry::CRY2-OCRL* délocalise du cytosol vers la membrane et que après quinze minutes dans le noir celui-ci est de nouveau dans le cytosol indique que le système optogénétique est fonctionnel. Toutefois l'étude de pupes à 16h APF (1^{ère} division asymétrique) montre aucune délocalisation du complexe *mcherry::CRY2-OCRL* (Figures 4 D à D'''). Le pilote *neur-P^{GAL4}* ne peut donc pas être utilisé pour cette étude, ce qui implique l'utilisation d'un pilote plus précoce et/ou plus fort afin de pouvoir relocaliser, par optogénétique, OCRL au niveau de la membrane plasmique à ce stade.

3.5. *pnr-GAL4*, un promoteur plus fort permettant une délocalisation rapide et une réversibilité au bout de 15 min dans les pupes à 16h APF

Les pupes *w; UASp>CIBN::pmGFP /+ ; UASp>mcherry::CRY2-OCRL/ pnr-GAL4* sont sélectionnées au stade larvaire par la double fluorescence (verte et rouge) de leurs glandes salivaires. Via les observations par microscopie, il est possible de constater qu'avant l'excitation la construction *mcherry::CRY2-OCRL* est uniformément répartie dans le cytoplasme, mais dès l'instant où l'exposition à 488nm commence, il est possible d'observer

une superposition des deux fluorescences au niveau de la membrane plasmique. Suite à l'excitation à 488nm, nous constatons que le complexe mcherry::CRY2-OCRL se délocalise du cytosol vers la membrane plasmique des cellules où se trouve la construction CIBN::pmGFP et ce en quelques secondes (Figures 5A à A''').

Suite à l'extinction du laser de longueur d'onde 488nm, il est possible de suivre l'évolution temporelle de la fluorescence issue de la construction mcherry::CRY2-OCRL. Au temps $t=0$ minute, qui correspond à l'extinction du laser 488nm, le complexe CIBN-CRY2 est formé donc la fluorescence de mcherry est localisée à la membrane. Au bout de 10 minutes la fluorescence au niveau de la membrane est atténuée mais le contour des cellules est encore visible, par contre à partir de 15 minutes le contour n'est plus visible. (Figures 5B à B''').

Les kymographes permettent d'observer l'évolution temporelle d'une zone choisie que ce soit dans le plan ou l'espace. Dans le cadre de l'étude, le suivi de la fluorescence autour de la membrane plasmique au cours de la réversibilité s'effectue par un kymographe dans le plan (Figure 5C). L'analyse de l'intensité de fluorescence, dans le plan de celui-ci à différents temps ($t=0$, 10 et 15 minutes), permet de suivre l'évolution de la construction mcherry::CRY2-OCRL. Le temps $t=0$ minute, qui correspond au début de la réversibilité, présente un pic de fluorescence unique dont la largeur à mi-hauteur est de 1 micron (Figure 5D). Au bout de 10 minutes l'atténuation de fluorescence se traduit par un pic de 2 microns de large (Figure 5D). A partir de 15 minutes, le kymographe ne présente plus de pic unique mais seulement des variations le long de l'axe (Figure 5D). Une analyse du kymographe dans l'espace permet en plus de dire que la relocalisation de mcherry::CRY2-OCRL à la membrane plasmique se fait le long de l'axe apico basal (Figures 5E et F) et également que la réversibilité se fait de façon uniforme selon cet axe.

Le fait qu'en quelques secondes, suite à une exposition au laser 488nm, la construction mcherry::CRY2-OCRL délocalise du cytosol vers la membrane et que après 15 minutes dans le noir celui-ci est de nouveau dans le cytosol concorde avec les cinétiques présentées dans des études récentes (Guglielmi et al. 2015). Cela suggère l'efficacité des constructions optogénétiques quand celles-ci s'expriment dans une partie du notum via le pilote *pnr-GAL4*.

3.6. Une précision spatiale correcte effectuée par sélection de zone d'intérêt à 2% de puissance laser 488nm

La précision spatiale est importante afin d'activer seulement les cellules d'intérêt ou une portion de cellule d'intérêt. Pour obtenir la meilleure précision possible, différents paramètres ont été testés : la puissance laser et la méthode utilisée par le logiciel (« zoom in » et sélection d'une zone d'intérêt). La mesure de l'aire de la zone activée permet d'évaluer l'efficacité de précision de ces méthodes et ce à différentes puissances laser.

La méthode du zoom in montre des aires d'activation supérieures à 1682 μm^2 (aires correspondant à l'image 41x41 μm^2) pour des puissances de 10 et 5% ce qui correspond à 5 et 2 μW (mesurées au multiphotomètre). Par contre une puissance de 2%, soit inférieure à 1 μW , présente une aire d'activation plus faible avec 1106 μm^2 d'activé (Figure 6). La deuxième méthode présente des aires d'activation plus faibles pour les mêmes puissances : 377 μm^2 et 469 μm^2 respectivement pour 10 et 5%. Pour une puissance de 2%, l'aire d'activation est de 234 μm^2 soit environ cinq fois moins que le zoom in (Figure 7). C'est donc la méthode de sélection de zone d'intérêt qui est retenue pour toutes les autres manipulations utilisant le module de FRAP.

3.7. Agrégation des complexes CIBN-CRY2

Les pupes du génotype *w; UASp>CIBN::pmGFP /+ ; UASp>mcherry::CRY2-OCRL/pnr-GAL4* sont mises dans trois conditions de développement afin d'étudier l'effet d'une localisation plus ou moins prolongée du complexe CIBN-CRY2 au niveau de la membrane plasmique ; et donc l'effet d'une déplétion en PI(4,5)P₂ plus ou moins importante au cours du développement. La première condition correspond à la condition témoin : les pupes sont conservées à l'étuve et subissent le cycle jour/nuit. Les deux autres conditions correspondent à un développement en présence continue de lumière ou en absence totale de lumière. Dans ces trois cas les pupes sont conservées à 25°C.

L'étude des différentes conditions s'effectue à partir de projection maximale sur 3,5 μm . Les pupes issues du cycle jour/nuit montrent, à t=0 minute, la présence d'agrégats à forte fluorescence mais dont le nombre diminue au cours du temps (Figures 8A, A' et A''). Cette diminution après l'activation suggère que ces agrégats sont des complexes CIBN-CRY2 présents sur certaines zones de la membrane, mais cela de manière réversible comme présenté

précédemment. L'analyse précédente des pupes n'exprimant que CIBN::pmGFP ou mcherry::CRY2-OCRL seul, ne montrait aucune présence de ces agrégats (Figures 1A à C). Cela indique que ces agrégats sont dus à l'expression conjointe des constructions. L'analyse des pupes dans les deux autres conditions (lumière permanente ou totalement dans le noir) permet d'observer un plus grand nombre de ces agrégats après l'activation (Figures 8B à C'').

L'utilisation de l'analyse de particules sur les projections maximales permet de quantifier le nombre d'agrégats par unité de surface au cours du temps dans les différentes conditions d'éclairages. Quelles que soient les conditions, le nombre d'agrégats par μm^2 à $t=0$ minute est équivalent (environ 0.6 agrégat par μm^2), par contre chaque condition présente une évolution différente au cours du temps. Les pupes issues du cycle jour/nuit présentent une diminution du nombre d'agrégats au cours du temps passant de 0,5 agrégat/ μm^2 pour $t=0$ minute, à moins de 0,1 agrégat/ μm^2 à $t=20$ minutes. Cela permet de montrer la réversibilité de ceux-ci, ce qui correspond à l'analyse visuelle précédemment effectuée. Les pupes issues des conditions d'éclairages permanent, ne montrent, quant à elles, aucune diminution significative du nombre d'agrégats même après 20 minutes sans activation optique. Pour la dernière condition, qui correspond à des pupes constamment dans le noir, celles-ci présentent une augmentation du nombre d'agrégats au cours du temps.

3.8. La formation des complexes CIBN-CRY2 n'induisant pas de phénotype

L'expression des constructions optogénétiques pourrait entraîner plusieurs effets tels qu'une létalité ou une modification du phénotype. Une des modifications de phénotype pouvant être attendue serait un défaut de différenciation au sein du lignage des organes sensoriels ; ce qui impliquerait un défaut dans la division asymétrique des SOPs.

Afin d'observer si les conditions de développement impliquent une létalité ou pas, certains tubes sont laissés dans leurs conditions jusqu'à éclosion. L'analyse de chaque tube permet de montrer la présence de ce génotype dans la proportion attendue, soit un sixième ou plus du nombre total de mouches adultes (Tableau 2). Quelle que soit la condition, le génotype n'entraîne pas une létalité. De plus chaque drosophile du génotype *w*; *UASp>CIBN::pmGFP* /+ ; *UASp>mcherry::CRY2-OCRL/ pnr-GAL4* a été analysée, mais aucun phénotype apparent n'est visible sur ces individus.

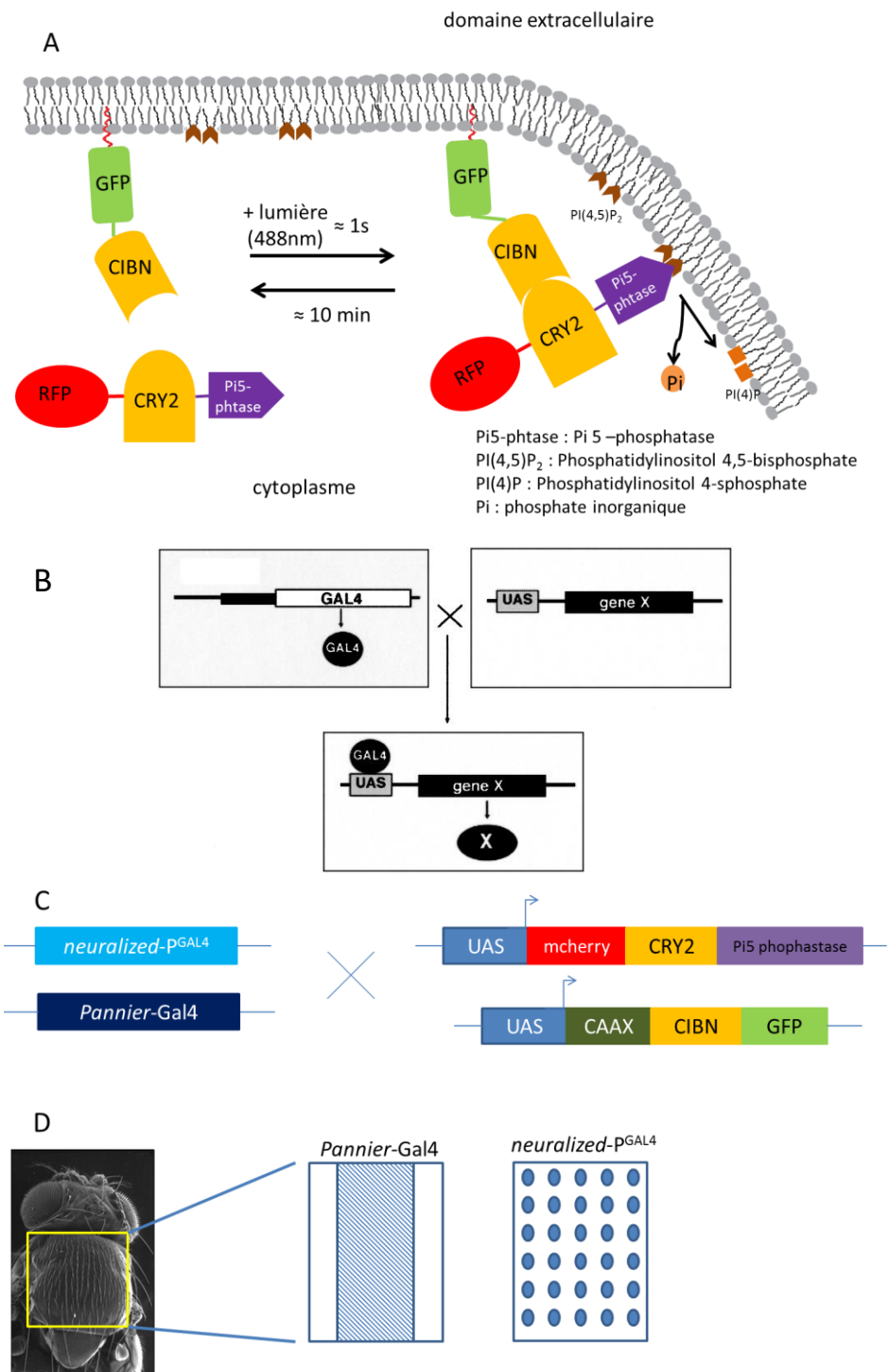


Figure 2 : Modèle d'expression des sondes optogénétiques sous la dépendance du système UAS-GAL4.

(A) Représentation schématique du système d'otogénétique utilisé. (B) Représentation schématique du système UAS-GAL4. (C) Sondes optogénétiques et promoteurs utilisés durant les expérimentations. (D) Modèle d'expression en fonction des promoteurs GAL 4 utilisés.

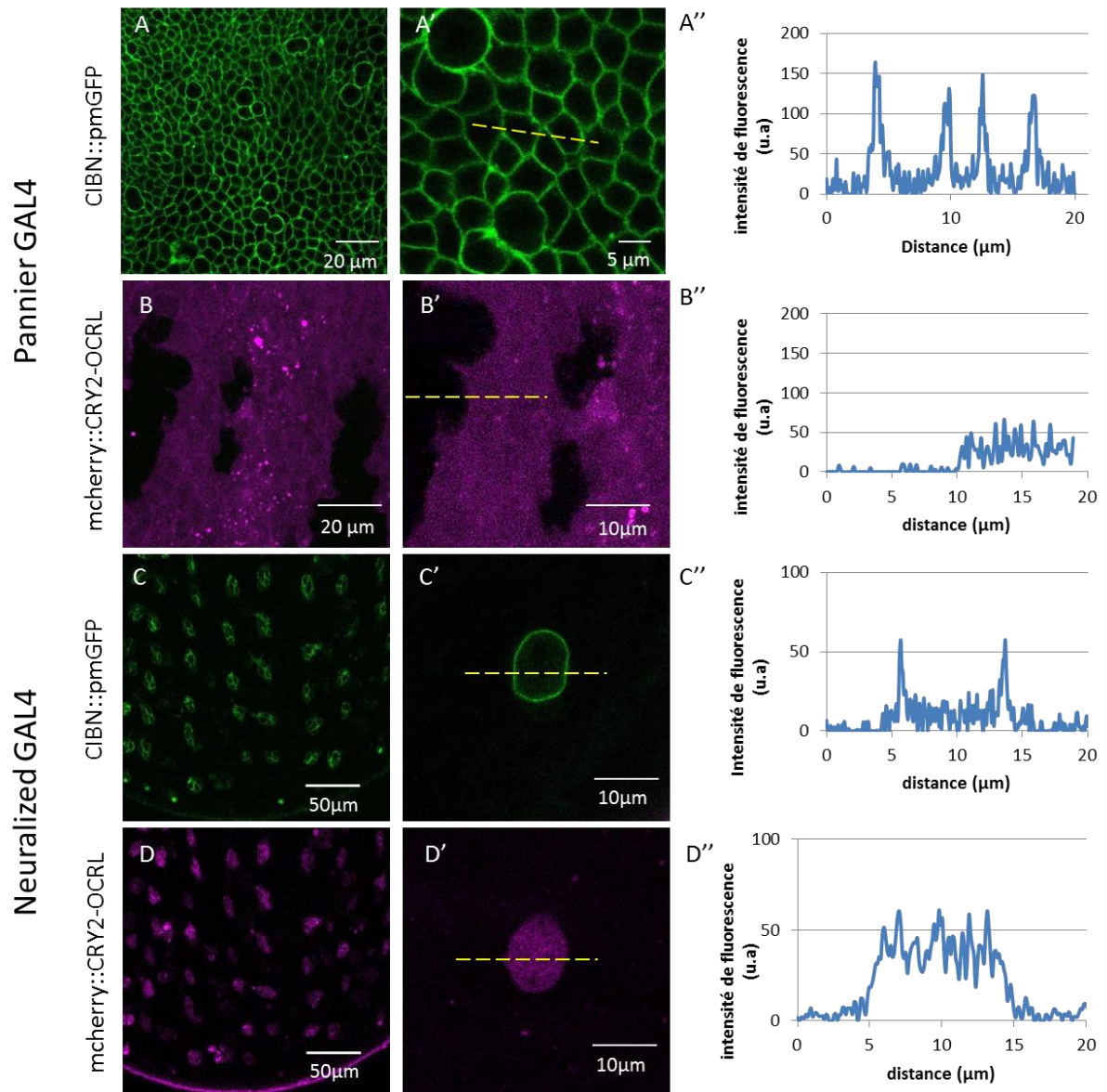


Figure 3 : Expression des sondes optogénétiques sous la dépendance des pilotes *pnr-GAL4* et *neur-P^{GAL4}*

(A à B'') correspondent au pilote *pnr-GAL4* et (C à D'') correspondent au pilote *neur-P^{GAL4}*. (A, A') Expression de CIBN::pmGFP associée à la membrane plasmique (n=4). (A'') Quantification de l'intensité de la fluorescence le long de l'axe jaune de la figure A'. (B, B') Expression de mcherry::CRY2-OCRL contenue dans le cytoplasme (n=3). (B'') Quantification de la fluorescence associée. L'unité de fluorescence est arbitraire. (C, C') Expression de CIBN::pmGFP associée à la membrane plasmique (n=4). (C'') Quantification de l'intensité de la fluorescence le long de l'axe jaune de la figure C'. (D, D') Expression de mcherry::CRY2-OCRL contenue dans le cytoplasme (n=4). (D'') Quantification de la fluorescence associée. L'unité de fluorescence est arbitraire. n correspond au nombre d'individus.

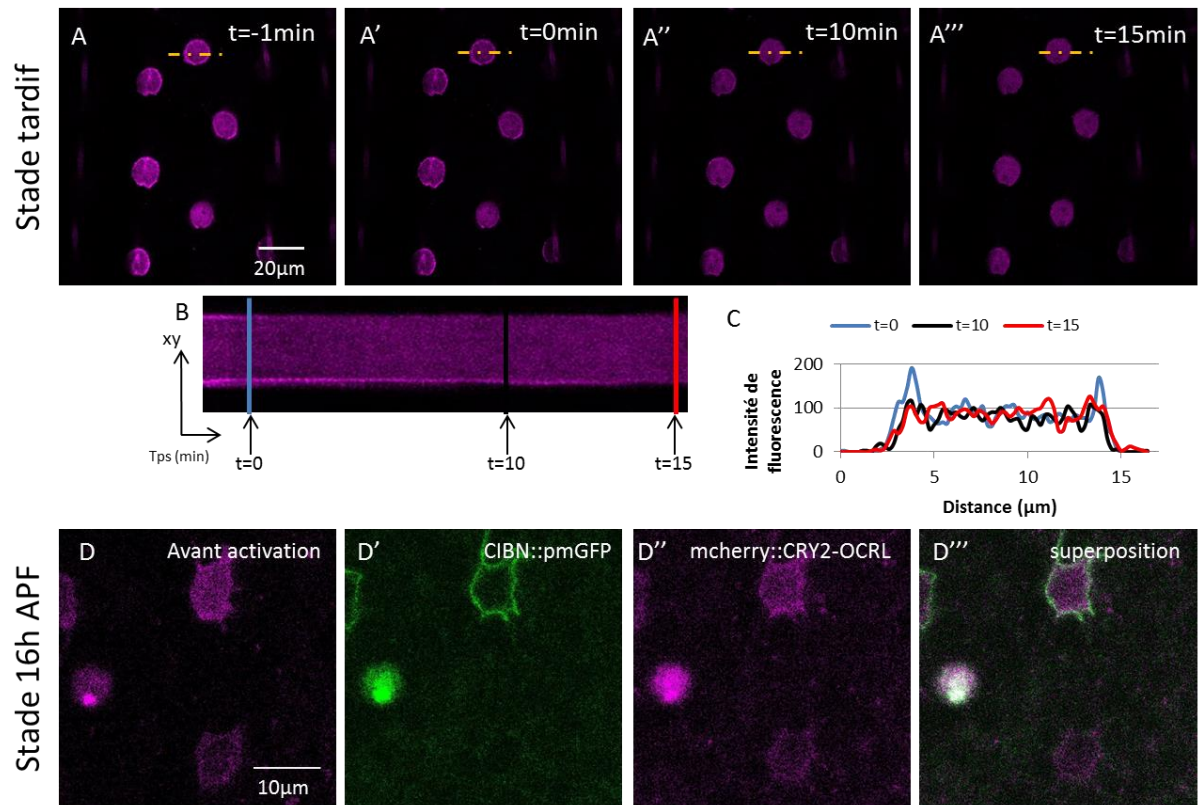


Figure 4 : Optogénétique sous la dépendance du pilote $neur-P^{GAL4}$.

(A, A', A'', A''') Réversibilité du complexe CIBN-CRY2 au cours du temps pour un stade tardif, t=-1 minute correspond à l'activation via le laser 488nm et t=0 minute correspond à son extinction (n=1). (B) Kymographe dans le plan correspondant au trait jaune sur les figures A à A'''. (C) Mesure de l'intensité de fluorescence du kymographe au trois temps présentés. (D, D', D'', D''') Expression simultanée de CIBN::pmGFP et mcherry::CRY2-OCRL sous stimulation optique de 488nm au stade 16h APF de la pupe (n=7).

n correspond au nombre d'individus.

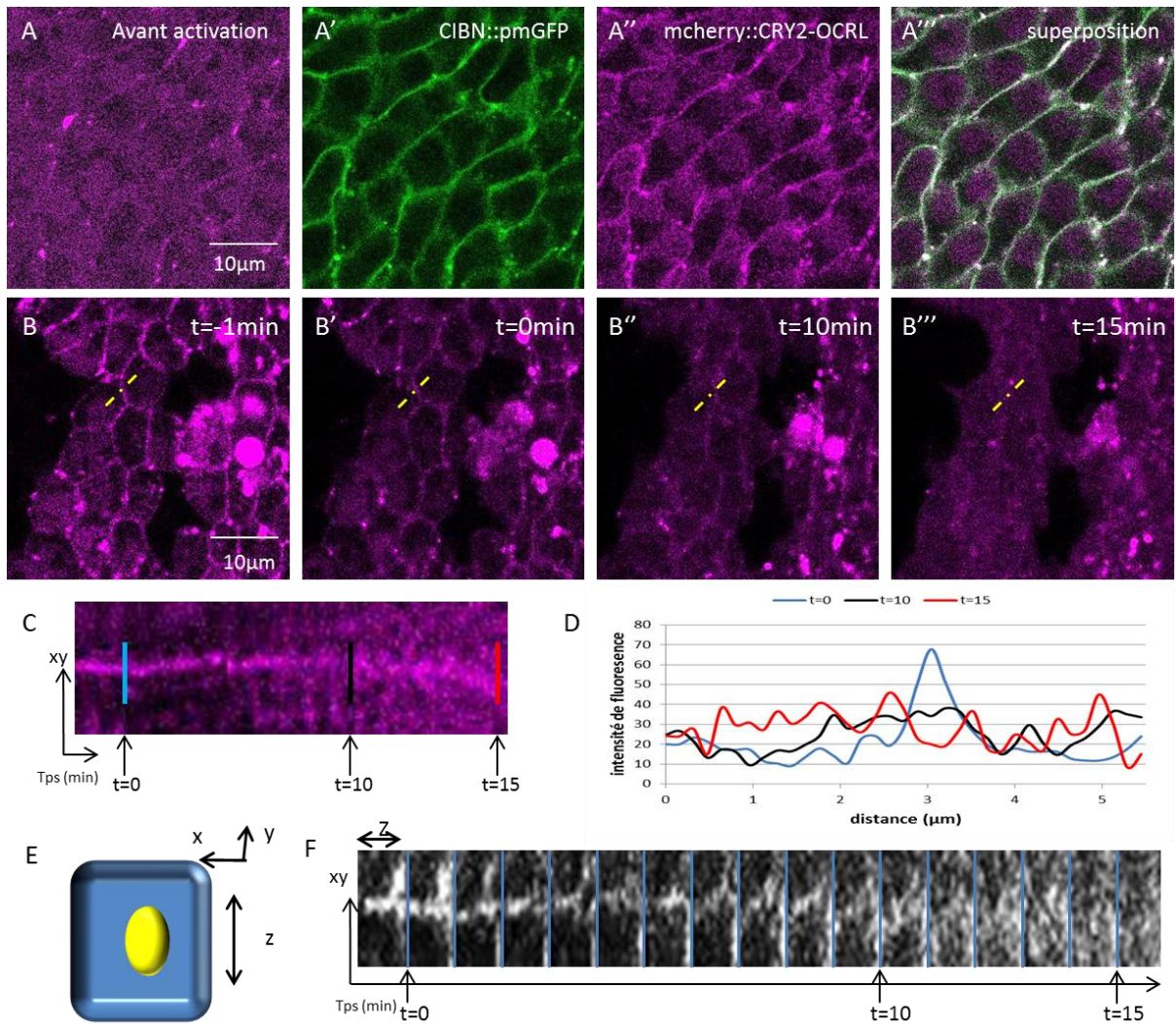


Figure 5 : Optogénétique sous la dépendance du pilote *pnr*-GAL4.

(A, A', A'', A''') Expression simultanée de CIBN::pmGFP et mcherry::CRY2-OCRL sous stimulation optique de 488nm. (B, B', B'', B''') Réversibilité du complexe CIBN-CRY2 au cours du temps, t=-1 minute correspond à l'activation via le laser 488nm et t=0 minute correspond à son extinction. (C) Kymographe dans le plan correspondant au trait jaune sur les figures B à B'''. (D) Mesure de l'intensité de fluorescence du kymographe au trois temps présentés. (E) Représentation schématique d'une cellule en trois dimensions. (F) Kymographe dans l'espace correspondant au trait jaune ; les traits bleus représentant le début d'une nouvelle minute.

(n=5)

n correspond au nombre d'individus.

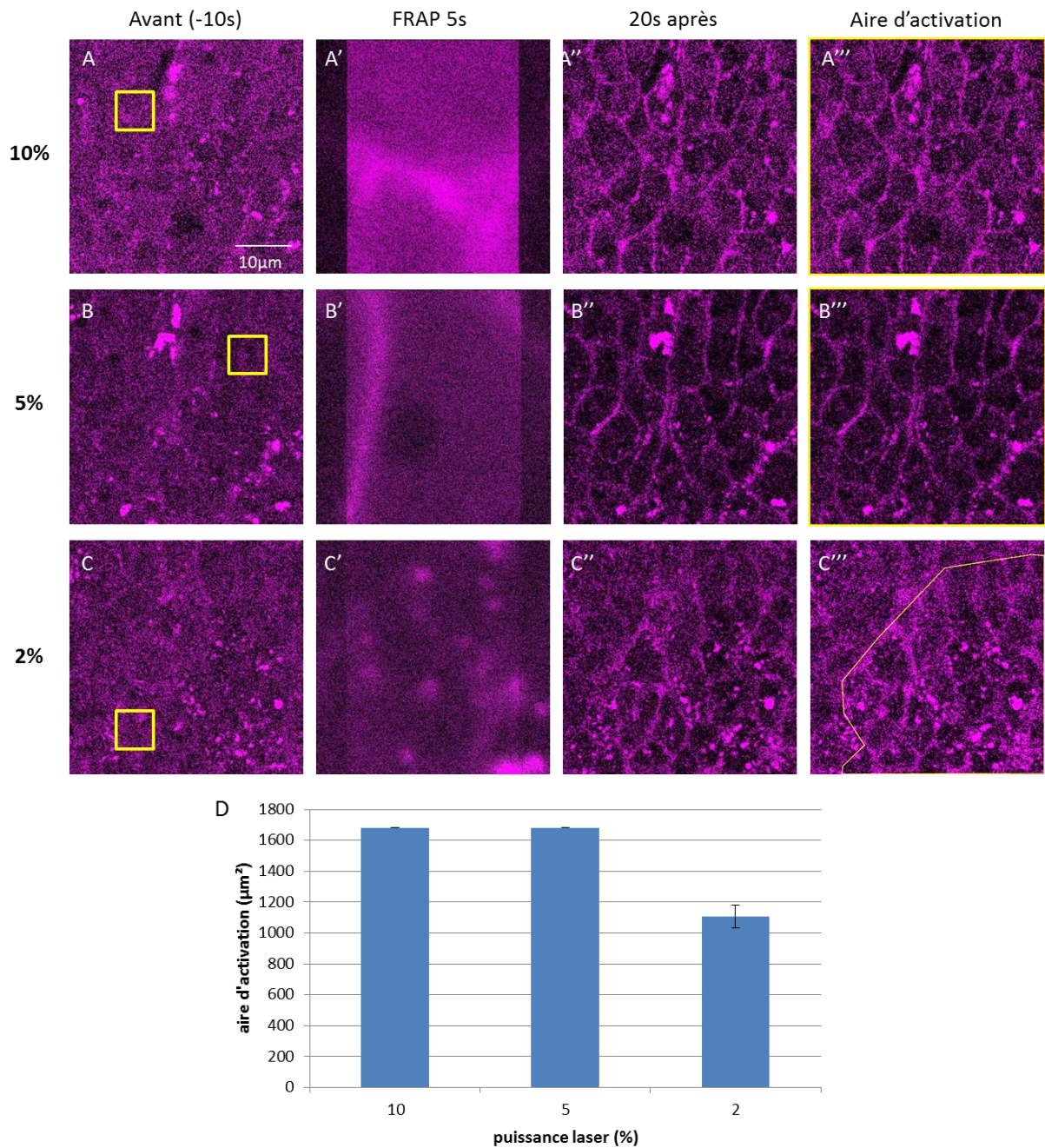


Figure 6 : Contrôle spatial de la zone d'activation par la méthode « zoom in ».

(A à C'') Evolution de la fluorescence de mcherry::CRY2-OCRL pour trois puissances laser (10, 5 et 2%). (A, B et C) correspondent à la fluorescence avant la stimulation au laser 488nm. (A', B', et C') correspondent à la fluorescence durant la stimulation, (A'', B'' et C'') à celle 20 secondes après cette stimulation et (A''', B''', C''') correspondent aux mesures d'aires. (D) Mesure des aires d'activation pour chaque puissance laser ; 1682μm² étant l'aire totale de l'image.

(n=3)

n correspond au nombre d'individus.

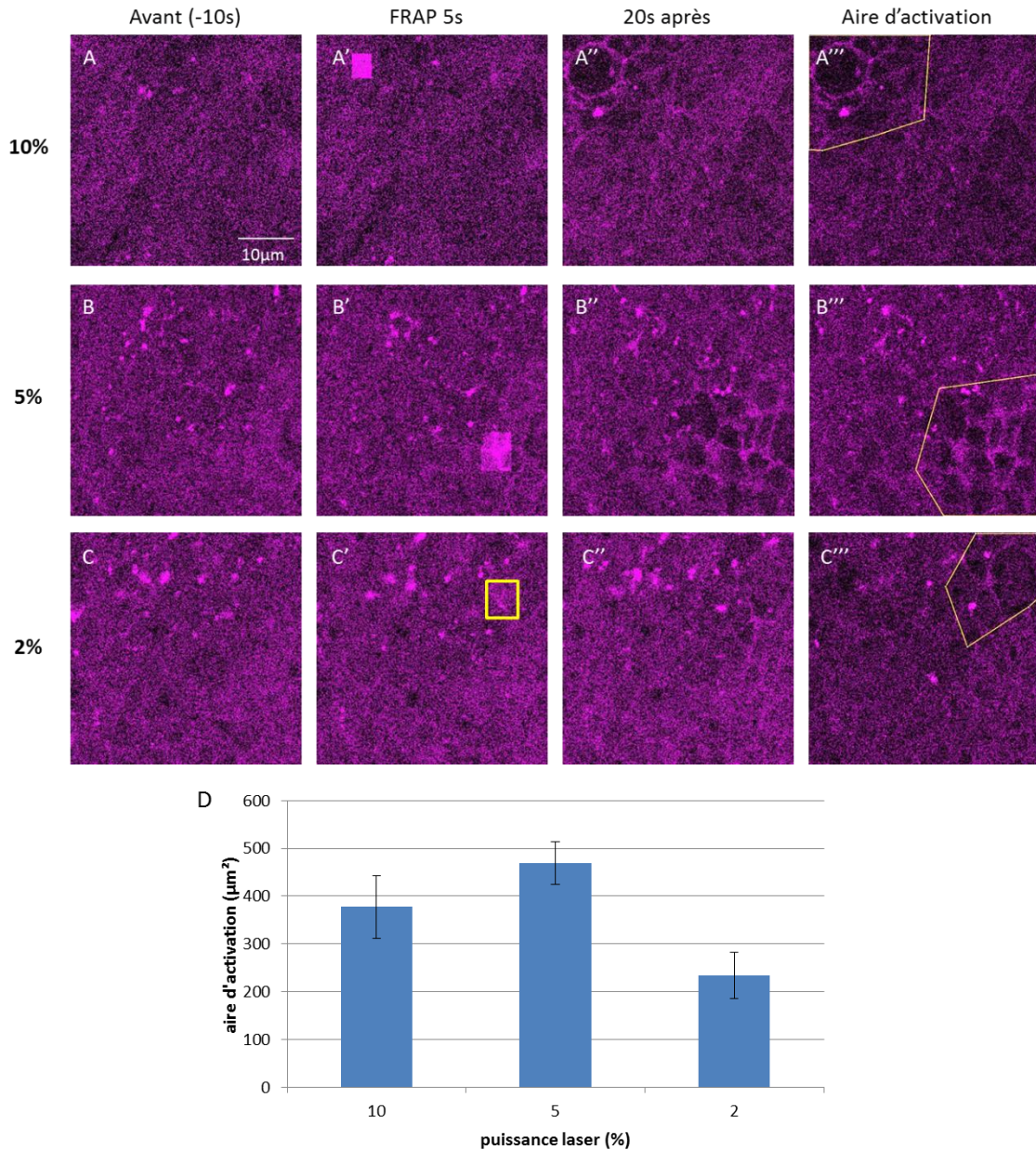


Figure 7 : Contrôle spatial de la zone d'activation par la méthode de sélection d'une zone d'intérêt.

(A à C'') Evolution de la fluorescence de mcherry::CRY2-OCRL pour trois puissances laser (10, 5 et 2%). (A, B et C) correspondent à la fluorescence avant la stimulation au laser 488nm. (A', B', et C') correspondent à la fluorescence durant la stimulation, (A'', B'' et C'') à celle 20 secondes après cette stimulation et (A''', B''', C''') correspondent aux mesures d'aires. (D) Mesure des aires d'activation pour chaque puissance laser ;1682 μm^2 étant l'aire totale de l'image.

(n=3)

n correspond au nombre d'individus.

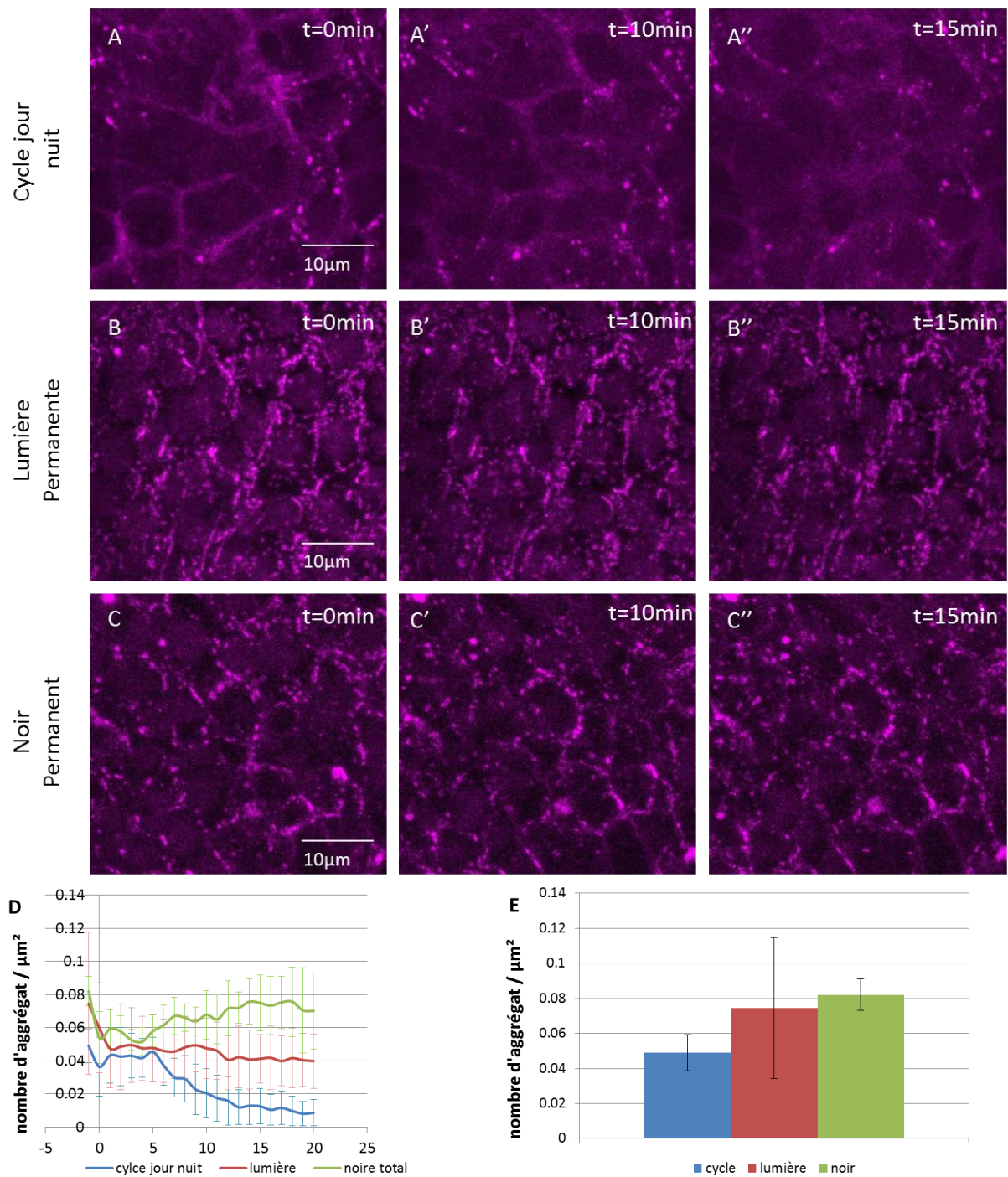


Figure 8 : Test des différentes conditions d'éclairage

(A à A'') Evolution temporelle du complexe CIBN-CRY2 dans la condition témoin (n=3). (B à B'') Evolution dans la condition lumière permanente (n=3). (C à C'') Evolution dans la condition noir permanent (n=3). (D) Quantification du nombre d'agrégats au cours du temps pour chaque condition. (E) Nombre d'agrégats pour chaque condition au temps t=0 minute. n correspond au nombre d'individus.

Condition de développement	Nombre d'individus du géotype <i>w</i> ; <i>UASp>CIBN::pmGFP</i> /+ ; <i>UASp>mcherry::CRY2-OCRL/ pnr-GAL4</i>	Nombre d'individus des géotypes : ● <i>w;UASp>CIBN::pmGFP/+; UASp>mcherry::CRY2-OCRL/TM3,ser</i> ● <i>w;UASp>CIBN::pmGFP/+; pnr-GAL4/TM3,sb</i> ● <i>w;Cyo/+;UASp>mcherry::CRY2-OCRL/ pnr-GAL4</i> ● <i>w;Cyo/+; pnr-GAL4/TM3,sb</i> ● <i>w;Cyo/+; pnr-GAL4/TM3,ser</i>	Total
Cycle jour nuit	17	80	94
Lumière permanente	22	59	81
Obscurité totale	28	44	72

Tableau 2 : Nombre d'individus pour chaque géotype et chaque condition d'éclairage

4. Discussion

L'objectif de ce projet était d'étudier le rôle des phosphoinositides dans la division asymétrique, par le développement méthodologique de l'optogénétique. Le choix de cette nouvelle méthode de manipulation optique a amené à définir les conditions d'utilisation de celle-ci. L'optogénétique est une méthode utilisée au départ pour l'étude du système neural sur les rongeurs (Adamantidis et al. 2007; Aravanis et al. 2007), et son utilisation sur d'autres types cellulaires est récente. Le fonctionnement des sondes CIBN et CRY2 avait déjà été testé au stade embryonnaire de la drosophile (Guglielmi et al. 2015), mais encore aucune étude n'avait testé cette méthode au stade pupal de la drosophile. Les résultats indiquent que le complexe CIBN-CRY2 se forme de façon contrôlée dans l'espace après exposition à 488nm. La formation de ce complexe est réversible.

4.1. Expression sous contrôle des pilotes *pnr-GAL4* et *neur-P^{GAL4}*

Dans cette étude, nous avons tout d'abord testé le pilote *neur-P^{GAL4}* qui permet une expression localisée dans les cellules précurseurs. Le but était d'avoir une précision spatiale d'activation à l'échelle de la cellule, la SOP. L'optogénétique est fonctionnelle avec une activation, c'est à dire la formation du complexe CIBN-CRY2 et une réversibilité. Toutefois, les niveaux d'expression des sondes sont insuffisants. En effet, le complexe se forme à un stade tardif de développement (>24h APF), quand l'organe est totalement formé. Par contre, à 16h APF aucun complexe CIBN-CRY2 n'a été détecté. Nous concluons que les sondes optogénétiques doivent être suffisamment exprimées pour que le complexe se forme et que OCRL soit relocalisée à la membrane plasmique. Ce résultat, a conduit à générer de nouveaux recombinants et à tester un pilote GAL4 plus précoce et/ou exprimé à plus fort niveau, le pilote *pnr-GAL4*

L'utilisation du pilote *pnr-GAL4* promeut l'expression des constructions dans toute la zone centrale du notum. En contrepartie, il n'est pas possible de discerner les SOPs sans y ajouter un marqueur d'identité (Figure 1). Les expériences menées avec ce pilote ont permis de valider le bon fonctionnement des sondes optogénétiques au stade de développement de la drosophile où se déroulent les divisions asymétriques des SOPs (16h APF). Les résultats démontrent qu'il est possible de déclencher la formation des complexes CIBN-CRY2 de façon contrôlée dans le temps et dans l'espace sur le notum de la drosophile, et ce de manière réversible. Les complexes se forment très rapidement (ordre de la seconde) et se défont de

façon plus lente ($t_{1/2} = 7.5$ min). Ces données sont tout à fait en accord avec la littérature et compatibles avec les temps de division des SOPs (30 minutes). Il est donc possible de former les complexes au cours de la division des SOPs sans impacter de manière durable la composition en PI(4,5)P₂ après la division cellulaire.

4.2. Précision spatiale d'activation

Le but de l'étude étant d'étudier la division asymétrique des SOPs, la recherche de la meilleure précision d'activation est nécessaire afin de cibler une cellule ou une partie de celle-ci, idéalement le croissant antérieur de Numb, soit un demi volume cellulaire. L'utilisation des modules mis à disposition par le logiciel de microscopie a permis d'effectuer les différents tests présentés (Figures 4 et 5). Même avec le module de sélection de zone d'intérêt et une puissance laser de 2%, plusieurs cellules sont activées. L'utilisation d'un laser bi-photon permet normalement une précision de l'ordre de la cellule (Guglielmi et al. 2015). Au cours de l'étude, le microscope confocal équipé d'un laser bi-photon a été utilisé. Toutefois, les expériences ont permis de révéler une fuite de laser (à la longueur d'ondes 900nm) même quand tous les paramètres sont à 0, ce qui entraîne une activation globale des sondes optogénétiques. Il s'agit d'un problème mécanique de l'obturateur qui est en cours de réparation. A ce stade, il est donc impossible de cibler une cellule ou une portion de cellule en particulier pour l'activer.

4.3. Conditions d'éclairement : formation des agrégats membranaires

Les différentes conditions d'éclairement, lors du développement des larves, entraînent la formation d'agrégats en nombre et taille variables. Leur réversibilité dans la condition témoin a permis de conclure que ces agrégats étaient dus au complexe CIBN-CRY2. Le fait que ceux-ci ne sont pas réversibles dans les conditions de lumière ou d'obscurité permanentes n'a pas été rapporté précédemment et n'est pas expliqué à ce jour. Une des hypothèses est que dans la condition témoin les cellules ont mis en place une adaptation face à ces agrégats durant les phases de nuit, ce qui permet la réversibilité. Dans les deux autres conditions, ce mécanisme n'est pas mis en place ou n'est pas assez fonctionnel. Précisément à la lumière, le complexe CIBN-CRY2 est en permanence activé ; le mécanisme de résorption serait donc saturé. Dans le noir le complexe n'est jamais activé avant la première observation ; le système de résorption ne serait donc pas encore activé, entraînant des agrégats qui ne sont pas réversibles.

Quelles que soient les conditions, le fait que des agrégats dus au complexe CIBN-CRY2 se forment reste inconnu. Une hypothèse peut être émise si la phosphatase est fonctionnelle. Les PI(4,5)P₂ jouent un rôle dans la fixation des protéines permettant l'endocytose telles que la Dynamine, protéine permettant la fusion membranaire (Benmerah and Lamaze 2002; Roux, Biais, and Bassereau 2007). La déplétion de PI(4,5)P₂ pourrait ainsi engendrer une perte du processus de fission membranaire dépendant de la Dynamine et entraîner alors une accumulation membranaire de PI(4)P.

4.4. formation des complexes CIBN-CRY2 à la membrane plasmique et déplétion des PI(4,5)P₂

Les expériences menées démontrent que les complexes CIBN-CRY2 se forment à la membrane plasmique comme attendu. CIBN étant fusionné à OCRL, nous prédisons que la composition en PI(4,5)P₂ devrait être affectée. L'hypothèse de départ est que la composition en PI(4,5)P₂ est essentielle pour permettre les interactions électrostatiques de Numb avec la membrane plasmique (Bailey and Prehoda 2015). La déplétion en PI(4,5)P₂ théoriquement produite par le recrutement de OCRL suite à la formation du complexe CIBN-CRY2, est donc attendue pour empêcher le recrutement de Numb à la membrane plasmique. Comme Numb est un répresseur de Notch, nous nous attendions à ce que le recrutement d'OCRL entraîne une hyperactivation de la voie Notch. L'étude des phénotypes n'a montré aucun phénotype de type Notch quelle que soit la condition de formation des complexes CIBN-CRY2 (lumière en continu, cycle jour/nuit, formation des complexes CIBN-CRY2 de 16 à 17h30 APF), au moment des divisions asymétriques et de l'activation de la voie Notch.

Ces résultats négatifs posent la question de la faisabilité de l'approche et de l'efficacité de la déplétion en PI(4,5)P₂. Plusieurs hypothèses peuvent être posées. La première est que la phosphatase n'est pas fonctionnelle, ce qui n'entraîne aucun changement pour les cellules. Toutefois, ces sondes ont été utilisées avec succès dans le cas de l'invagination du mésoderme chez l'embryon de drosophile. Face à ces résultats préliminaires, nous proposons premièrement de séquencer les lignées de drosophile dont nous disposons pour vérifier qu'elles sont correctes. Deuxièmement, il est envisageable d'utiliser un rapporteur de la composition en PI(4,5)P₂ pour vérifier l'efficacité de la déplétion suite au recrutement d'OCRL. Un rapporteur potentiel est la sonde PH-GFP. Il s'agit d'une protéine chimérique où la GFP est couplée au domaine PH de la phospholipase Cδ (Gervais et al. 2008), un domaine protéique interagissant spécifiquement avec les PI(4,5)P₂. La déplétion en PI(4,5)P₂


entraînerait la disparition de la PH-GFP de la membrane plasmique. Pour réaliser cette expérience, il est possible d'utiliser la lignée CIBN::pm non étiquetée par la GFP. Troisièmement, il est aussi possible que les cellules s'adaptent à la déplétion en Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, ce qui n'entraînerait aucun effet sur le phénotype. La dernière hypothèse serait que la déplétion n'est pas suffisante pour entraîner une modification notable de la composition en PI(4,5)P₂. Si cette hypothèse est correcte, l'utilisation de pilotes GAL4 plus forts que *pnr*-GAL4 est envisagée (*actine*, *tubuline*, *ubiquitine*-GAL4 par exemple).

Dans cette étude nous avons défini les conditions expérimentales permettant de relocaliser de manière contrôlée dans le temps et l'espace l'inositol 5-phosphatase à la membrane plasmique. Nous avons mis en avant le fait que la relocalisation de l'ordre de la seconde et que la réversibilité de l'ordre de la minute étaient dépendant de la puissance d'excitation et de la zone d'activation. Ces travaux ouvrent des voies d'investigations autour des effets sur les niveaux de PI(4,5)P₂ et l'étude du lien *in-vivo* entre l'ancrage de Numb et les PI(4,5)P₂ dans l'acquisition d'identités cellulaires.

5. Références bibliographiques

- Adamantidis, Antoine R., Feng Zhang, Alexander M. Aravanis, Karl Deisseroth, and Luis de Lecea. 2007. “Neural Substrates of Awakening Probed with Optogenetic Control of Hypocretin Neurons.” *Nature* 450 (7168): 420–24. doi:10.1038/nature06310.
- Aravanis, Alexander M., Li-Ping Wang, Feng Zhang, Leslie A. Meltzer, Murtaza Z. Mogri, M. Bret Schneider, and Karl Deisseroth. 2007. “An Optical Neural Interface: In Vivo Control of Rodent Motor Cortex with Integrated Fiberoptic and Optogenetic Technology.” *Journal of Neural Engineering* 4 (3): S143. doi:10.1088/1741-2560/4/3/S02.
- Bailey, Matthew J., and Kenneth E. Prehoda. 2015. “Establishment of Par-Polarized Cortical Domains via Phosphoregulated Membrane Motifs.” *Developmental Cell* 35 (2): 199–210. doi:10.1016/j.devcel.2015.09.016.
- Benmerah, Alexandre, and Christophe Lamaze. 2002. “Endocytose : chaque voie compte !” *M/S : médecine sciences* 18 (11): 1126–36.
- Borgne, Roland Le, Allison Bardin, and François Schweisguth. 2005. “The Roles of Receptor and Ligand Endocytosis in Regulating Notch Signaling.” *Development* 132 (8): 1751–62. doi:10.1242/dev.01789.
- Claret, Sandra, Julie Jouette, Béatrice Benoit, Kevin Legent, and Antoine Guichet. 2014. “PI(4,5)P₂ Produced by the PI4P5K SKTL Controls Apical Size by Tethering PAR-3 in *Drosophila* Epithelial Cells.” *Current Biology* 24 (10): 1071–79. doi:10.1016/j.cub.2014.03.056.
- Deisseroth, Karl. 2011. “Optogenetics.” *Nature Methods* 8 (1): 26–29. doi:10.1038/nmeth.f.324.
- Gervais, Louis, Sandra Claret, Jens Januschke, Siegfried Roth, and Antoine Guichet. 2008. “PIP5K-Dependent Production of PIP₂ Sustains Microtubule Organization to Establish Polarized Transport in the *Drosophila* Oocyte.” *Development* 135 (23): 3829–38. doi:10.1242/dev.029009.
- Gho, Michel, Yohanns Bellaïche, and François Schweisguth. 1999. “Revisiting the *Drosophila* Microchaete Lineage: A Novel Intrinsically Asymmetric Cell Division Generates a Glial Cell.” *DEVELOPMENT-CAMBRIDGE* 126: 3573–3584.
- Guglielmi, Giorgia, Joseph D. Barry, Wolfgang Huber, and Stefano De Renzis. 2015. “An Optogenetic Method to Modulate Cell Contractility during Tissue Morphogenesis.” *Developmental Cell* 35 (5): 646–60. doi:10.1016/j.devcel.2015.10.020.
- Horvitz, H. Robert, and Ira Herskowitz. 1992. “Mechanisms of Asymmetric Cell Division: Two Bs or Not Two Bs, That Is the Question.” *Cell* 68 (2): 237–55. doi:10.1016/0092-8674(92)90468-R.

- Idevall-Hagren, O., E. J. Dickson, B. Hille, D. K. Toomre, and P. De Camilli. 2012. "Optogenetic Control of Phosphoinositide Metabolism." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (35): E2316–23. doi:10.1073/pnas.1211305109.
- Jafar-Nejad, Hamed, Melih Acar, Riitta Nolo, Haluk Lacin, Hongling Pan, Susan M. Parkhurst, and Hugo J. Bellen. 2003. "Senseless Acts as a Binary Switch during Sensory Organ Precursor Selection." *Genes & Development* 17 (23): 2966–78. doi:10.1101/gad.1122403.
- Jan, Yuh Nung, and Lily Yeh Jan. 1998. "Asymmetric Cell Division." *Nature* 392 (6678): 775–78. doi:10.1038/33854.
- Le Borgne, Roland. 2006. "Regulation of Notch Signalling by Endocytosis and Endosomal Sorting." *Current Opinion in Cell Biology*, Cell regulation, 18 (2): 213–22. doi:10.1016/j.ceb.2006.02.011.
- Nández, Ramiro, Daniel M. Balkin, Mirko Messa, Liang Liang, Summer Paradise, Heather Czapla, Marco Y. Hein, James S. Duncan, Matthias Mann, and Pietro De Camilli. 2014. "A Role of OCRL in Clathrin-Coated Pit Dynamics and Uncoating Revealed by Studies of Lowe Syndrome Cells." *eLife* 3 (August): e02975. doi:10.7554/eLife.02975.
- Rhyu, Michelle S., Lily Yeh Jan, and Yuh Nung Jan. 1994. "Asymmetric Distribution of Numb Protein during Division of the Sensory Organ Precursor Cell Confers Distinct Fates to Daughter Cells." *Cell* 76 (3): 477–91. doi:10.1016/0092-8674(94)90112-0.
- Roux, Aurélien, Nicolas Biais, and Patricia Bassereau. 2007. "Import-export dans la cellule." *Pour la science*, no. 355: 46–52.
- Schweisguth, François. 2015. "Asymmetric Cell Division in the *Drosophila* Bristle Lineage: From the Polarization of Sensory Organ Precursor Cells to Notch-Mediated Binary Fate Decision: Asymmetric Cell Division in an Epithelium." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 4 (3): 299–309. doi:10.1002/wdev.175.
- Taslimi, Amir, Justin D. Vrana, Daniel Chen, Sofya Borinskaya, Bruce J. Mayer, Matthew J. Kennedy, and Chandra L. Tucker. 2014. "An Optimized Optogenetic Clustering Tool for Probing Protein Interaction and Function." *Nature Communications* 5 (September): 4925. doi:10.1038/ncomms5925.
- van Meer, Gerrit, Dennis R. Voelker, and Gerald W. Feigenson. 2008. "Membrane Lipids: Where They Are and How They Behave." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9 (2): 112–24. doi:10.1038/nrm2330.
- Westhoff, Britta, Ivan N. Colaluca, Giovanni D'Ario, Maddalena Donzelli, Daniela Tosoni, Sara Volorio, Giuseppe Pelosi, et al. 2009. "Alterations of the Notch Pathway in Lung Cancer." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (52): 22293–98. doi:10.1073/pnas.0907781106.

	Diplôme : Agronomie Spécialité : Science Cellulaires et Moléculaires du Vivant Spécialisation / option : Enseignant référent : Jean-Marc Frasin
Auteur(s) : Pierre-Alexis Billa Date de naissance* : 17 avril 1993	Organisme d'accueil : IGDR Adresse : 2 Avenue Léon Bernard, 35043 Rennes CEDEX
Nb pages : 30 Annexe(s) : 0	Maître de stage :
Année de soutenance : 2016	
Titre français : Rôle des phosphoinositides dans la division asymétrique	
Titre anglais : Role of phosphoinositides in the asymmetric division	
Résumé (1600 caractères maximum) : La division cellulaire asymétrique est un mécanisme par lequel la diversité de destins cellulaires est générée au cours du développement. L'épithélium du thorax de <i>Drosophile</i> a été utilisé comme modèle d'étude. Il s'agit d'un épithélium monocouche au sein duquel un précurseur subit une série de divisions asymétriques. A chaque division, le déterminant d'identité cellulaire Numb localise à un pôle de la cellule et ségrège dans une cellule fille pour réprimer la voie Notch. <i>In-vitro</i> Numb se lie aux phospholipides PI(4,5)P ₂ par des interactions électrostatiques, un mécanisme qui contribuerait à sa répartition asymétrique. L'étude a consisté à tester cette hypothèse <i>in-vivo</i> . Pour moduler le niveau de PI(4,5)P ₂ à la membrane plasmique nous avons développé une approche d'optogénétique basée sur la dimérisation rapide et réversible de deux protéines de plante (CRY2 et CIBN) suite à une excitation à 488 nm. Pour réduire la concentration de PI(4,5)P ₂ à la membrane plasmique, l'inositol 5-phosphatase OCRL couplée à CRY2 est relocalisée par liaison à CIBN ancrée à la membrane plasmique. Cette étude a permis de définir les conditions expérimentales de relocalisation d'OCRL de façon contrôlée dans le temps et l'espace, une étape clé pour tester le rôle de PI(4,5)P ₂ dans la localisation inégale de Numb.	
Abstract (1600 caractères maximum) : Asymmetric cell division is a mechanism by which cell fate diversity is generated during the development. The epithelium of <i>Drosophila</i> thorax has been used as a model. This monolayer epithelium is composed of precursor cells that divide asymmetrically. At each division, the cell fate determinant Numb localizes at one pole of the cell and represses the Notch pathway in one of the daughter cells. <i>in-vitro</i> experiments show that Numb binds to PI(4,5)P ₂ phospholipids by electrostatic interactions, which is a mechanism that could contribute to its asymmetric repartition. The aim of this study is to test this hypothesis <i>in-vivo</i> . To modulate the PI(4,5)P ₂ level at the plasma membrane, we developed an optogenetic approach based on the fast and reversible dimerization of two plant proteins (CRY2 and CIBN) under excitation at 488nm. To decrease the PI(4,5)P ₂ concentration at the plasma membrane, the inositol 5-phosphatase OCRL fused to CRY2 is relocalized by its binding to CIBN anchored at the plasma membrane. This study permitted to precize the experimental conditions of the relocalization of OCRL in a space- and time-controlled manner. This work constitute an important step to next test the role of PI(4,5)P ₂ in the unequal Numb localization.	
Mots-clés : optogénétique, division asymétrique, organe sensoriel, épithélium, phosphatidylinositol	
Key Words: optogenetic, asymmetric division, sensory organ, epithelium, phosphatidylinositol	

* Élément qui permet d'enregistrer les notices auteurs dans le catalogue des bibliothèques universitaires