



Institut Gilbert Laustriat

# Thèse

présentée pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Louis Pasteur  
Strasbourg I

Discipline: Sciences du vivant  
Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

par

**Julien BELLIS**

## **Contribution des divisions orientées à la morphogénèse des cryptes intestinales et conséquences cellulaires de mutations hétérozygotes dans le gène suppresseur de tumeurs Apc**

Soutenue publiquement le 28 Novembre 2008

### **Membres du jury**

Directeur de Thèse:	Prof Jan De MEY, ESBS, Strasbourg
Co-directeur de Thèse:	Dr Jean-Noël FREUND, INSERM, Strasbourg
Rapporteur interne:	Dr Michèle KEDINGER, INSERM, Strasbourg
Rapporteur externe:	Dr Matthieu PIEL, Institut Curie, Paris
Examineur:	Dr Christine PERRET, Institut Cochin, Paris
Examineur:	Prof Anne-Catherine SCHMIT, IBMP, Strasbourg



## REMERCIEMENTS

Je remercie les Dr Michèle Kedinger, Anne-Catherine Schmit, Matthieu Piel et Christine Perret d'avoir accepté de juger ce travail

Je souhaite remercier Pierre Travo, qui est responsable de toute cette aventure Alsacienne !

Je remercie plus particulièrement le Dr Jean-Noël Freund et le Pr Jan De Mey, mes deux co-directeurs de thèse, pour l'encadrement constant et l'aide apportée tout au long de cette thèse. Mes connaissances en biologie cellulaire étaient maigres à mon arrivée dans le labo de Jan, et inexistantes dans le domaine de la cancérogenèse. Grâce à des discussions approfondies et nombreuses avec Jan et Jean-Noël j'ai pu progressivement développer mes connaissances et m'approprier la plupart des concepts sous-jacents à mon travail de thèse. Je tiens à les remercier de leur volonté constante de m'intégrer à leurs réflexions. Je tiens également à les remercier pour leur patience dans la progression de mon travail, me laissant une très grande autonomie et liberté dans la gestion du projet.

Je remercie les membres passés ou présent du labo, parmi lequel Lucinda, Emma, les étudiants Irène, Awa et Alexandre pour leur contribution à ce travail, Tessa et Anne-Marie. Je remercie Denis pour sa disponibilité et ses coups de mains précieux sur le microscope. Un très grand merci à Marie-Jo, qui fut d'une aide plus appréciable au labo, et accessoirement très bonne cuisinière.

Un énorme merci à Cédric et Dorothée, compagnons de longue date, à qui je souhaite un bon départ aux states et j'espère à très bientôt à NY !

Je remercie les amis présents au quotidien, en premier lieu Pierre-Jacques, inégalable, ainsi qu'Adonis, Arnaud et Thomas, Laure et Sabrina.

Je remercie mes parents, pour m'avoir permis d'arriver jusqu'ici, mon frère Alexandre qui m'a fait comprendre que la Biologie c'est bien mais les maths c'est mieux, et ma sœur Isadora qui me rappelle qu'il n'y a pas que la science dans la vie, la musique compte aussi.

Enfin je remercie Mirella pour tout et plus encore.

# Table des matières

<b>Table des Figures</b>	<b>vi</b>
<b>1 Mécanismes moléculaires de l'orientation et du positionnement du fuseau dans les épithélia</b>	<b>1</b>
1.1 Rôle et importance des mécanismes contrôlant l'orientation . . . . .	1
1.1.1 Rôle dans le développement, les divisions orientées et les divisions asymétriques . . . . .	2
1.2 Caractéristiques générales de la division dans une cellule épithéliale polarisée	4
1.2.1 La cellule épithéliale en mitose : caractéristiques et organisation . .	4
1.3 Rôle des interactions entre microtubules astériens et le cortex, et des complexes moteurs . . . . .	7
1.3.1 Les Microtubules : rôle et importance de leur dynamique . . . . .	7
1.4 Les principaux modèles d'étude de la division . . . . .	12
1.4.1 La première division de l'embryon <i>C. elegans</i> . . . . .	12
1.4.2 Le développement du SOP chez la drosophile . . . . .	14
1.4.3 Division du neuroblaste chez la drosophile . . . . .	15
1.4.4 Un cas de division symétrique : les divisions symétriques de l'épithélium chez la drosophile . . . . .	16
1.5 Rôles des complexes moléculaires . . . . .	17
1.5.1 Les protéines PAR : protéines clés dans l'établissement de la polarité	17
1.6 Régulation des complexes moléculaires impliqués dans la génération de force	22
1.6.1 Les protéines $G_{\alpha i}$ dans la régulation des générateurs de force . . . .	23
1.6.2 Les protéines G chez les mammifères : connection avec le fuseau et NuMA via LGN . . . . .	25
1.6.3 Implication des protéines GOA-1, GPA-16 et de leur interacteurs GPR-1/2 et Ric-8 dans la régulation des forces chez <i>C. elegans</i> . . .	28
1.6.4 Rôle de Pins et Ric-8 dans la régulation des protéines G et dans le contrôle de l'orientation et de l'alignement chez la drosophile . . . .	34
1.6.5 Mud agit sous le contrôle de Pins dans l'orientation du fuseau dans le neuroblaste . . . . .	38
1.6.6 Rôle de Lin-5 et de la Dynéine chez <i>C. elegans</i> . . . . .	39
1.6.7 Générateurs de force . . . . .	40
1.7 La protéine APC en mitose et dans la polarité . . . . .	44
1.7.1 Domaines protéique et interactants d'APC . . . . .	45
1.7.2 Localisations d'APC . . . . .	46

1.7.3	Quelques fonctions importantes d'APC . . . . .	47
1.8	L'adhésion dans la régulation de l'orientation du fuseau mitotique . . . . .	51
1.8.1	Influence de l'adhésion sur l'organisation interne de la cellule et l'orientation du fuseau mitotique . . . . .	52
1.8.2	Rôle de la signalisation des intégrines dans l'alignement du fuseau . . . . .	55
1.8.3	Quelques exemples de problèmes dus à une dérégulation du contrôle de l'orientation . . . . .	57
<b>2</b>	<b>Cancer du côlon et morphogenèse</b>	<b>59</b>
2.1	Description du tissu normal . . . . .	60
2.1.1	La muqueuse colique . . . . .	60
2.1.2	Dynamique et composition de l'épithélium des cryptes . . . . .	60
2.2	Mise en place du tissu au cours de l'embryogenèse et parallèle avec la tubulogenèse . . . . .	62
2.2.1	Embryogenèse du côlon . . . . .	62
2.2.2	Crypte et tubulogenèse . . . . .	64
2.3	Les voies de signalisation Wnt et Notch : rôle dans la régulation de la prolifération, différenciation et dans l'homéostasie de la crypte . . . . .	66
2.3.1	La voie Notch . . . . .	66
2.3.2	La voie Wnt . . . . .	68
2.3.3	Rôle de la voie Wnt dans l'épithélium intestinal et le cancer . . . . .	69
2.3.4	L'épithélium intestinal : un tissu intégré . . . . .	70
2.4	Cellules souches : maintien de l'homéostasie et rôle possible dans la cancérogenèse du côlon . . . . .	71
2.4.1	Caractéristiques et rôle dans l'homéostasie de la crypte . . . . .	71
2.4.2	Dérégulation des divisions asymétriques et cancérogenèse . . . . .	73
2.4.3	Théorie du brin immortel ou la ségrégation non aléatoire du brin parental comme un mécanisme de division asymétrique . . . . .	74
2.5	Le processus de fission de la crypte . . . . .	76
2.6	Les cryptes aberrantes. . . . .	77
2.6.1	Types et Caractéristiques . . . . .	77
2.7	Caractéristiques des modèles murins porteurs d'une mutation dans le gène APC. . . . .	81
2.7.1	Modèles animaux de mutations dans <i>Apc</i> . . . . .	82
2.7.2	Types d'ACF produites dans les différents modèles . . . . .	84
2.8	Loss Of Heterozygosity . . . . .	85
	<b>Objectifs</b>	<b>87</b>
	<b>Résultats</b>	<b>89</b>
	Article : APC contributes to crypt homeostasis through control of Oriented Cell Division. . . . .	90
	Traitement des cellules par ANR interfèrent contre la protéine CLIP-170 pour tester les fonctions de la Dynéine . . . . .	121
	Analyse des divisions dans la niche par segmentation sur des acquisitions à haute résolution . . . . .	133

<b>Discussion et Perspectives</b>	<b>137</b>
APC et la polarité apico-basale : rôle direct ou implication dans un complexe moléculaire? . . . . .	137
APC dans la régulation des générateurs de force . . . . .	138
APC et PCP : quel lien? . . . . .	141
Le cancer du côlon et l'instabilité chromosomique : rôle d'APC et/ou de la voie Wnt? . . . . .	144
APC, les centrosomes et la polarité . . . . .	145
<b>Appendices</b>	<b>148</b>
Annexe 1 : Caractérisation des Réseaux de Gènes Impliqués dans l'Orientation du Fuseau . . . . .	148
Annexe 2 : Proposition d'un système d'étude phénotypique de gènes candidats par microscopie à haut-débit . . . . .	163
Annexe 3 : Programmes Matlab . . . . .	166
Annexe 4 : Logiciels Utilisés . . . . .	209
<b>Glossaire</b>	<b>214</b>
<b>Index</b>	<b>218</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>221</b>

# Table des figures

1.1	Divisions orientées chez <i>Sicyonia ingentis</i> . . . . .	2
1.2	Divisions orientées dans l'aile de la <i>Drosophile</i> . . . . .	3
1.3	La Polarité Planaire . . . . .	3
1.4	Domaines membranaires et arrondissement de la cellule en mitose . . . . .	5
1.5	Déroulement assymétrique de la Cytocinèse . . . . .	6
1.6	Héritage assymétrique du pied basal . . . . .	6
1.7	Instabilité dynamique des Microtubules . . . . .	9
1.8	Phase de polymérisation et de dépolymérisation d'un microtubule inter- phasique . . . . .	10
1.9	Microtubules en mitose . . . . .	10
1.10	Première division dans l'embryon <i>C.elegans</i> . . . . .	13
1.11	Divisions du SOP . . . . .	14
1.12	Première division du neuroblaste . . . . .	16
1.13	Localisation des protéines PAR dans l'embryon une cellule <i>C.elegans</i> . . . . .	18
1.14	Localisation des protéines PAR et déterminants cellulaires dans le neuro- blaste chez la drosophile . . . . .	20
1.15	Localisation des complexes Pins/ $G_{\alpha i}$ et Baz/Par-6/aPKC dans la cellule pI et le Neuroblaste chez la drosophile . . . . .	21
1.16	Signalisation par un récepteur couplé à une protéine G . . . . .	24
1.17	Principales protéines décrites dans l'orientation du fuseau . . . . .	26
1.18	Formation du complexe NuMA/LGN/ $G_{\alpha i}$ en mitose . . . . .	27
1.19	Résumé des phénotypes des différents mutants . . . . .	31
1.20	Cycle de la protéine GOA-1 . . . . .	33
1.21	Cycle de la protéine GPA-16 . . . . .	33
1.22	Polarisation du cortex sous l'action des microtubules . . . . .	35
1.23	Alignement du fuseau dans le SOP sous contrôle de Frizzled, $G_{\alpha i}$ et Pins . . . . .	37
1.24	Connexion de Mud au cortex via Pins et $G_{\alpha i}$ . . . . .	39
1.25	Formation du complexe Lin5-GPR-1/2- $G_{\alpha i}$ en mitose et lien avec la Dynéine . . . . .	40
1.26	Domaines de la Dynéine . . . . .	41
1.27	Implication de la Dynéine chez la levure bourgeonnante . . . . .	43
1.28	Domaines et interagants d'APC . . . . .	45

1.29	Hétérogénéité corticale dictée par l'adhésion . . . . .	53
1.30	L'Orientation du fuseau est dictée par l'adhésion interphasique . . . . .	54
1.31	Rôle de la signalisation dépendante des intégrines dans l'alignement planaire du fuseau . . . . .	55
1.32	Allongement du tissu chez le poisson Zèbre . . . . .	57
2.1	Organisation de la muqueuse intestinale . . . . .	60
2.2	Comparaison de l'organisation de la muqueuse de l'intestin grêle et du côlon . . . . .	61
2.3	Embryogenèse du côlon . . . . .	63
2.4	Les principaux mécanismes de formation d'un tube . . . . .	65
2.5	Formation d'un lumen connecté à un kyste par une sécrétion polarisée . . . . .	65
2.6	Principales voie de signalisation à l'œuvre dans la crypte . . . . .	67
2.7	La voie Wnt . . . . .	69
2.8	Mécanismes permettant le maintien d'une population de cellules souches . . . . .	74
2.9	Schéma de la théorie du brin immortel . . . . .	76
2.10	Processus de fission symétrique d'une crypte . . . . .	76
2.11	Cryptes aberrantes de type hyperplasique et dysplasique . . . . .	79
2.12	Cryptes aberrantes de type 'classiques' . . . . .	79
2.13	Cryptes aberrantes de type 'Dysplasiques' . . . . .	80
2.14	Cryptes aberrantes de type 'BCAC' . . . . .	81
2.15	Fission asymétrique de cryptes et statut du gène <i>Apc</i> . . . . .	82
3.1	Western blotting montrant la diminution de CLIP-170 72h après traitement par ARN interférent . . . . .	123
3.2	Immunofluorescence montrant la diminution de CLIP-170 après traitement par ARN interférent . . . . .	124
3.3	Conséquence de la diminution de CLIP-170 par ARN interférent sur le comportement du fuseau et la congression des chromosomes . . . . .	126
3.4	Résumé des phénotypes pour les mitoses analysées . . . . .	128
3.5	Analyse morphométrique sous Amira . . . . .	134
3.6	Représentation 3D sous Amira . . . . .	134
3.7	Acquisition sur NuMA et représentation sous Amira avec une vue orthogonale . . . . .	135
A-1	Représentation graphique des scores de corrélation positive et négative à l'intérieur et entre les six régions des réseaux transcriptionnels de la puce MG-U74v2 (souris) . . . . .	153
A-2	Représentation graphique de la structure générale des quatre réseaux construits . . . . .	154
A-3	Représentation graphique du sous réseau de 78 gènes . . . . .	156
A-4	Représentation graphique du sous-réseau des 8 gènes clefs . . . . .	157
A-5	Représentation graphique des corrélations positives et négatives après arrangement des probesets selon l'ordre des clusters, en abscisses, et selon l'ordre des groupes de probesets d'intérêt, en ordonnées . . . . .	158

A-6	Début de la liste des gènes du cluster 12 . . . . .	160
A-7	Représentation graphique du sous-réseau du cluster 12. . . . .	161
A-8	Catégorisation des conditions biologiques pour le cluster 12. . . . .	162
A-9	Principales étapes d'une analyse à grande échelle couplant de la microscopie à l'ARN interférent . . . . .	165

# Chapitre 1

## Mécanismes moléculaires de l'orientation et du positionnement du fuseau dans les épithélia

### 1.1 Rôle et importance des mécanismes contrôlant l'orientation

Les mécanismes qui assurent l'orientation et le positionnement du fuseau mitotique jouent un rôle capital dans différents systèmes morphogéniques pendant le développement ainsi qu'à l'âge adulte. Ces mécanismes sont particulièrement importants dans les processus impliquant la détermination d'une forme au cours de l'embryogenèse. Cette partie traite de l'importance du contrôle de ces mécanismes à travers quelques exemples de développement. Quelques exemples de phénotypes liés à une perturbation de ces mécanismes sont également décrits en fin de chapitre.

L'étude de l'orientation et du positionnement du fuseau a montré que le fuseau est soumis à des forces. Ces forces sont exercées via les microtubules astériens par des complexes moléculaires que l'on regroupe sous le nom de générateurs de force. Ces générateurs de force comprennent des complexes moteurs et d'autres régulateurs de la dynamique des microtubules astériens. L'étude de ces générateurs de force vise à identifier les différents complexes capables de générer des forces sur le fuseau, à comprendre leurs interactions avec le cortex cellulaire mitotique, et enfin à comprendre comment leur localisation et leur régulation permettent *in fine* de dicter l'orientation du fuseau. L'orientation du fuseau est capital dans les cellules de mammifères où la position du plan de clivage lors de la cytokinèse est directement sous le contrôle de la position du fuseau (Rappaport, 1986; 1997). C'est donc l'orientation du fuseau qui détermine la position des deux cellules filles après la mitose. Ces processus d'orientation sont aussi particulièrement importants dans le cas de divisions asymétriques où le fuseau est orienté en rapport avec une polarité pré-

établie en interphase. Après assemblage du fuseau celui-ci est orienté selon cette polarité et ceci permet la ségrégation asymétrique de facteurs.

### 1.1.1 Rôle dans le développement, les divisions orientées et les divisions asymétriques

L'observation d'un axe préférentiel d'orientation du fuseau dans certains organismes modèles a soulevé des questions sur les modalités et le but de ce mécanisme. De nombreux cas de divisions orientées étant étudiés, ce paragraphe n'a pas pour but de détailler l'ensemble de ces exemples mais d'en montrer les plus caractéristiques et intéressants pour notre discussion.

L'observation de divisions stéréotypées chez le nématode *C. elegans* (Sulston *et al.*, 1983; Hyman & White, 1987) a permis de montrer l'importance des mécanismes contrôlant l'orientation du fuseau dans le développement d'organismes. On retrouve ce mécanisme de divisions stéréotypées chez la crevette *Sicyonia ingentis*, où le contrôle rigoureux de l'orientation est particulièrement frappant (cf figure 1.1) (Hertzler & Clark, 1992).

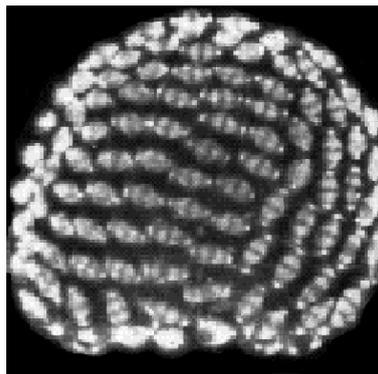


FIGURE 1.1 – Divisions orientées chez *Sicyonia ingentis*

Un embryon au stade 242 cellules après 9 cycles de division. L'embryon est immunomarcqué avec la  $\beta$ -tubuline. Les cellules au centre montrent le contrôle global de l'orientation des fuseaux, on parle de divisions orientées lorsque l'ensemble des fuseaux est orienté selon un axe global. D'après (Hertzler & Clark, 1992)

Les mécanismes contrôlant l'orientation du fuseau sont aussi importants au cours de la gastrulation des vertébrés (Gong *et al.*, 2004). Récemment l'importance des divisions orientées a été montrée chez la mouche *D. melanogaster* comme un mécanisme capital qui contribue à la forme finale des organes chez l'adulte (Baena-López *et al.*, 2005).

D'une façon générale les processus de divisions orientées et de polarité planaire sont capitaux pour la morphogénèse. On parle d'*Oriented Cell Division (OCD)* lorsque l'axe avec lequel s'aligne le fuseau d'une cellule mitotique n'est pas aléatoire mais au contraire pré-déterminé par rapport à l'axe d'un tissu (Strutt, 2005). Un mécanisme particulier joue un rôle majeur dans la régulation de l'orientation d'un ensemble de cellules à l'échelle

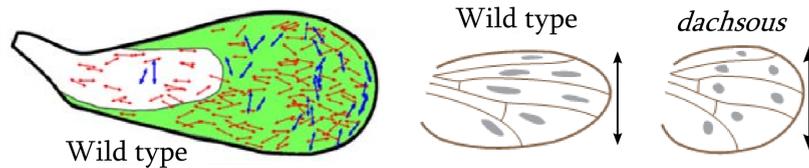


FIGURE 1.2 – Divisions orientées dans l'aile de la Drosophile

La situation dans une aile de Drosophile sauvage est représentée à gauche, qui montre les orientations selon l'axe de l'aile en rouge et orthogonales à cet axe en bleu. La plupart des divisions s'orientent selon l'axe proximo-distal, contribuant à l'allongement de l'aile. Une mutation dans le gène *Dachsous* provoque une perturbation de ces divisions orientées, ce qui se traduit par un élargissement de l'aile. D'après (Baena-López *et al.*, 2005; Strutt, 2005)

d'un tissu, c'est le phénomène de *Planar Cell Polarity (PCP)*. Ce terme désigne l'établissement d'une polarité dans le plan d'un épithélium par la localisation de complexes moléculaires corticaux selon l'axe d'un tissu, l'axe long ou antéro-postérieur par exemple (cf figure 1.3).

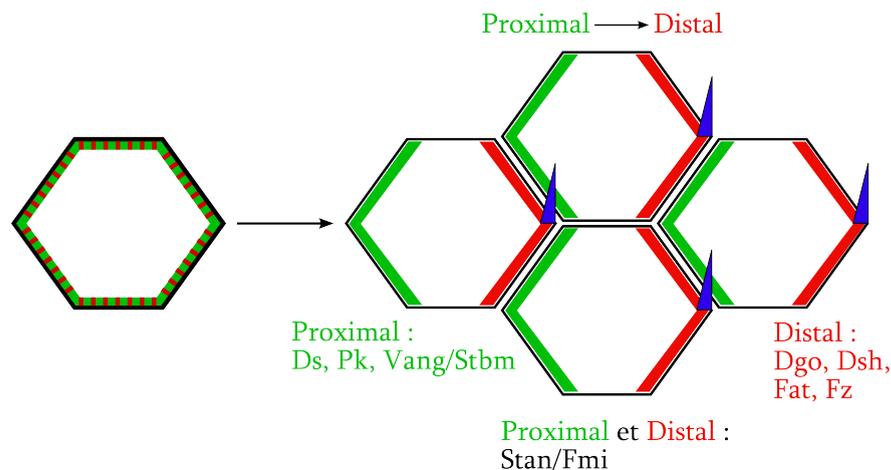


FIGURE 1.3 – La Polarité Planaire

La polarité planaire est visible à l'échelle du tissu par la localisation asymétrique des protéines impliquées dans ce processus. La situation dans les cellules d'aile de Drosophile est ici représentée. Lors de l'établissement de la polarité planaire, les protéines sont localisées apicalement mais non ségréguées (partie gauche du schéma). Suite à un signal encore non identifié ces protéines adoptent leur localisation caractéristique, avec *Daschous (Ds)*, *Prickle(Pk)*, *VanGogh/Strabismus(Vang/Stbm)* au cortex proximal de la cellule, *Starry night/Falmingo (Stan/Fmi)* au cortex proximal et distal, et *Diego(Dgo)*, *Dishevelled(Dsh)*, *Fat* et *Frizzled(Fz)* au cortex distal. La redistribution des protéines a lieu juste avant l'apparition du poil épidermique, représenté ici en bleu. D'après (Wang & Nathans, 2007; Montcouquiol, 2007)

Cette polarité planaire est capitale dans la régulation de processus impliquant un groupe de cellules, comme la fermeture du tube neural pendant le développement qui implique la migration coordonnées des cellules mais également la division orientée pendant la morphogénèse des organes. En effet les gènes impliqués dans le contrôle de la polarité

planaire sont souvent également impliqué dans la division orientée. Ainsi le gène *Dachsous*, permet l'acquisition d'une polarité planaire et joue également un rôle dans le contrôle des divisions orientées. Une perturbation de la fonction de ce gène entraîne un problème d'orientation des fuseaux avec l'axe du tissu, ce qui se traduit par des ailes plus large que la normale dans les mutants (Baena-López *et al.*, 2005; Strutt, 2005). A l'échelle d'un tissu la division peut donc être orientée selon une polarité pré-établie, le contrôle de l'orientation reposant sur l'orientation du fuseau avec l'axe de polarité grâce à des complexes moléculaires agissant sur le fuseau. Certains des mécanismes moléculaires à l'œuvre dans ce processus seront décrits plus loin.

L'importance du contrôle de l'orientation est également capitale dans le déroulement de division dites asymétriques c'est à dire où les deux cellules filles issues de la division n'ont pas les mêmes caractéristiques et ont dans la plupart des cas un devenir cellulaire différent.

Les divisions asymétriques qui ont lieu au cours de la première division de l'embryon de *C. elegans*, dans le système du Sensory Organ Precursor ou du neuroblaste de *D. melanogaster* seront détaillées plus loin (cf partie 1.4 page 12).

## 1.2 Caractéristiques générales de la division dans une cellule épithéliale polarisée

Les modalités de la mitose dans une cellule épithéliale polarisée sont connues grâce à des études sur cellules fixées principalement. Cette partie aborde les modalités 'physiques' du positionnement du fuseau dans une cellule épithéliale en division. Dans une deuxième partie seront exposés les mécanismes moléculaires à l'œuvre dans certains modèles d'études de la division.

### 1.2.1 La cellule épithéliale en mitose : caractéristiques et organisation

Cette partie introduit les notions importantes relatives à l'organisation structurale et au positionnement du fuseau dans une cellule épithéliale mitotique. Le but n'est pas de détailler l'ensemble des connaissances actuelles sur cette question mais de mettre en valeur les points essentiels de ce processus.

#### Jonctions et domaines membranaires

La caractéristique principale d'une cellule épithéliale est d'être intégrée au sein d'un épithélium. Cet épithélium peut être simple c'est à dire monocouche, ou stratifié. Cette partie décrit la situation des épithéliums simple. Le maintien de la cellule dans l'épithélium implique l'établissement de jonctions avec les cellules environnantes. Ces jonctions sont

de deux types et assurent plusieurs fonctions. On trouve des jonctions de type serrées et des jonctions de type adhérentes ainsi que des héli-desmosomes. Les jonctions serrées assurent l'étanchéité entre les deux milieux situés de part et d'autre de l'épithélium. Cette étanchéité implique dans le cas de l'intestin que le transit des nutriments et des ions s'effectuent et soit régulé par les cellules épithéliales.

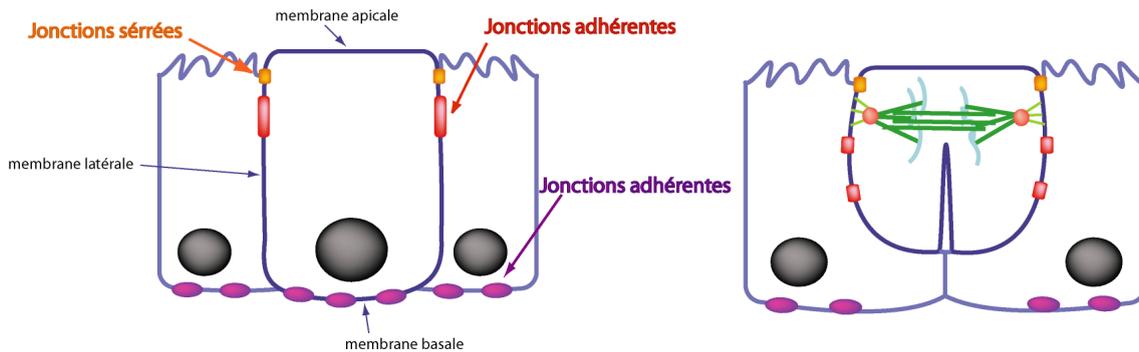


FIGURE 1.4 – Domaines membranaires et arrondissement de la cellule en mitose

Vue latérale d'une cellule épithéliale polarisée. La membrane apicale se situe au dessus des jonctions serrées, la membrane baso-latérale en dessous (partie gauche du schéma). En mitose la cellule s'arrondit, les jonctions adhérentes latérales sont redistribuées, les jonctions serrées restent assemblées. Le sillon de cytokinèse progresse du bas de la cellule vers le haut (partie droite du schéma).

En mitose les jonctions serrées ainsi que les jonctions adhérentes vont rester assemblées, avec une relocalisation importante des jonctions adhérentes le long de la membrane plasmique latérale (Baker & Garrod, 1993; Reinsch & Karsenti, 1994) (cf figure vreffig-MDCK). La présence de ces jonctions sépare la membrane en deux domaines membranaires bien distincts, tant par la localisation que par sa composition (van Meer & Simons, 1988; Simons & van Meer, 1988). La membrane située au dessus des jonctions serrées est appelée membrane apicale, la membrane en dessous est appelée membrane baso-latérale. Il existe des voies d'exocytose et/ou d'adressage de protéines spécifiques à ces domaines, permettant de maintenir cette asymétrie de domaines membranaires (Gibson & Perrimon, 2003; Lecuit, 2004).

### Positionnement du fuseau

Dans une cellule épithéliale polarisée le noyau occupe une position basale. Lors de l'entrée en mitose le noyau va migrer vers le haut de la cellule, avant rupture de l'enveloppe nucléaire (**NEB** en anglais pour *Nuclear Envelope Breakdown*). Il a été postulé que le maintien des jonctions serrées pendant la mitose facilite l'intégration par les deux cellules filles post-mitotique de l'épithélium, et diminue ainsi le temps requis pour devenir fonctionnelle au sein de cet épithélium.

La cellule s'arrondit et se détache de la lamina basale (Reinsch & Karsenti, 1994). Le fuseau se positionne à peu près au milieu de la cellule mitotique. Celle-ci étant très

arrondie, le fuseau se retrouve au dessus du milieu de la hauteur de la cellule interphasique et très proche des jonctions serrées. Suivant les modèles le fuseau subit des réorientations qui changent son orientation finale dans le plan de l'épithélium, avant la séparation des pôles et la cytokinèse. Les deux cellules filles réintègrent l'épithélium et ré-établissent des jonctions avec la lamina basale. Le déroulement de la cytokinèse est asymétrique (cf figure 1.5), le plan de clivage partant du bas de la cellule pour remonter vers le pôle apical, permettant le maintien des jonctions serrées durant la mitose et une réintégration rapide des cellules filles dans la monocouche (Baker & Garrod, 1993; Reinsch & Karsenti, 1994; Fleming *et al.*, 2007).

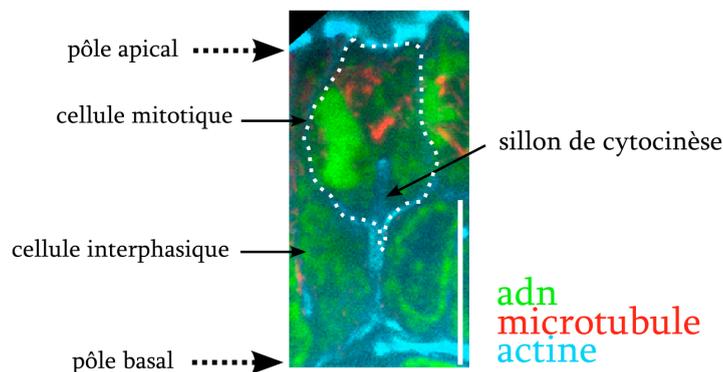


FIGURE 1.5 – Déroulement assymétrique de la Cytokinèse

Le sillón de cytokinèse progresse du bas de la cellule vers le haut. Image extraite d'une acquisition réalisée sur une crypte. Barre =  $10\mu$ . D'après (Fleming *et al.*, 2007)

Des questions subsistent sur le rapport précis qu'entretient la cellule mitotique avec la lamina basale, à savoir si la cellule perd tout contact avec la lamina basale où si il subsiste des fibres de rétraction comme c'est le cas dans les cellules non polarisées (Thery *et al.*, 2005). Il existe également dans certains modèles un mécanisme d'héritage assymétrique du pôle basal, ce qui constitue *de facto* une division assymétrique (cf figure 1.6). Ce mécanisme opère dans le neuroépithélium de la rétine chez le poisson zèbre et dans le neuroépithélium de mammifères (Wodarz & Huttner, 2003; Das *et al.*, 2003; Fishell & Kriegstein, 2003).

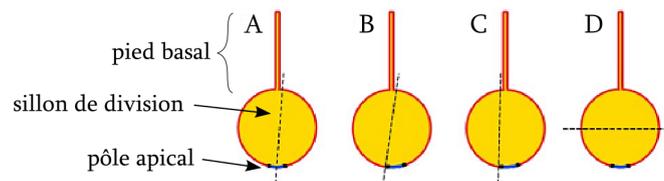


FIGURE 1.6 – Héritage assymétrique du pied basal

Le pôle apical est en bas, représenté en bleu. Suivant l'alignement planaire du fuseau par rapport au pôle apical, le pôle apical sera transecté ou non. Ceci crée plusieurs situations, le pied basal et le pôle apical pouvant être hérités par deux cellules différentes (cas représenté en B et D), ou la même cellule (cas représenté en C). D'après (Wodarz & Huttner, 2003)

## 1.3 Rôle des interactions entre microtubules astériens et le cortex, et des complexes moteurs

La question des mécanismes régissant l'orientation du fuseau et des forces agissant sur le fuseau a été étudiée dans de nombreux modèles, et a bénéficié des apports majeurs de la génétique et de l'imagerie. Cette partie traite des propriétés fondamentales des structures par lesquelles s'exercent les forces, les microtubules, ainsi qu'une partie des complexes moteurs et de leurs régulateurs à l'œuvre dans ce processus.

### 1.3.1 Les Microtubules : rôle et importance de leur dynamique

#### Structure et dynamique

Les Microtubules sont constitués par l'assemblage en un tube creux d'hétérodimères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ . Ces hétérodimères forment un protofilament. Ces protofilaments s'assemblent à leur tour pour former un tubule creux de 13 protofilaments. Cette structure est polarisée, le bout  $\oplus$  et le bout  $\ominus$  symbolisant les deux extrémités du tube. La succession des tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  est invariante dans le protofilament, et l'ajout d'un hétérodimère se fait toujours par incorporation de la tubuline  $\beta$  coté  $\oplus$ . Il en résulte que le coté  $\ominus$  se termine par les tubulines  $\alpha$  des protofilaments (cf figure 1.7 page 9). L'ajout de nouveaux dimères peut se faire des deux cotés, généralement le côté  $\oplus$  présente une dynamique plus importante que le côté  $\ominus$ . En réalité *in vivo* le coté  $\ominus$  est souvent stabilisé dans une structure à partir de laquelle le microtubule va polymériser, stabilisation due à la liaison de protéines spécifiques formant un 'cap'. Un microtubule oscille entre des phases de polymérisation, dépolymérisation, et de pause. On parle de l'instabilité dynamique d'un microtubule. Cette dynamique est plus ou moins importante suivant la phase du cycle cellulaire. De nombreuses modifications post-transcriptionnelles sont observées sur la tubuline. Ces modifications incluent la détyrosination (retrait de la tyrosine Cter de l' $\alpha$ -tubuline nouvellement synthétisée), la déglutamination (retrait de la glutamine après la tyrosine Cter de l' $\alpha$  nouvellement synthétisée) et la polyglutamination qui consiste en l'ajout de chaînes de glutamate de taille variable.

Un microtubule polymérise généralement à partir d'un Microtubule-Organizing Center (MTOC). La tubuline est liée au GTP, lorsque le dimère se lie au microtubule en phase de polymérisation, ce GTP est hydrolysé en GDP, ce qui fragilise l'association du dimère au reste du filament. On retrouve ainsi un 'cap' de tubuline-GTP au bout  $\oplus$  des microtubules, alors que le reste du microtubule contient de la tubuline-GDP. Plusieurs événements peuvent être identifiés dans le cycle d'un microtubule : on observe ainsi une phase de polymérisation caractérisée par l'ajout de dimères au côté  $\oplus$ , une phase de dépolymérisation caractérisée par un désassemblage rapide sous forme d'épluchement des microfilaments, et des événements de 'sauvetage' ou de 'catastrophe' qui sont un

passage de l'un à l'autre de ces états (cf figure 1.7 page suivante). Un dernier état mal compris est celui de 'pause', où le microtubule ne croît n'y ne dépolymérise. On parle d'instabilité dynamique pour qualifier les processus de régulation de la dynamique des microtubules, ce terme indiquant qu'un microtubule passe d'un état de polymérisation à un état de dépolymérisation avec des fréquences variables, qui vont conditionner sa taille et son comportement.

Dans une cellule interphasique, les Microtubules sont organisés en un cytosquelette émanant du MTOC et se propagent dans toutes les directions. Une partie de ces microtubules est stabilisée, leur dynamique étant nettement réduite voir inexistante. On trouve dans cette catégorie des microtubules polyglutaminylés et détyrosinés.

Des expériences de photoblanchiment sur une région englobant le MTOC ont permis de mieux décrire la dynamique des microtubules en interphase (Komarova *et al.*, 2002a). Un microtubule nucléé au niveau du MTOC commence à polymériser. Le microtubule croît à une vitesse quasi constante et ne subit pratiquement jamais d'évènements de catastrophe avant d'atteindre le bord de la cellule. Lors du contact avec le bord cellulaire le microtubule subit une succession d'évènements de catastrophe et de sauvetage. Ceci se traduit par un comportement du microtubule qui contacte le bord cellulaire puis dépolymérise plusieurs fois, jusqu'à ce que le microtubule dépolymérise complètement jusqu'au MTOC (cf figure 1.8 page 10).

Cette situation pourrait être légèrement différente dans certaines cellules et/ou localisation. Il existe au niveau basal de cellules MDCK un réseau microtubulaire, dont le comportement apparaît lié à l'existence de patch d'APC (Reilein & Nelson, 2005). Ces microtubules suivent des routes passant par des points d'APC à la membrane basale, un microtubule pouvant dépolymériser jusqu'à un point d'APC et rester en pause avant de repolymériser. La protéine APC localisée à la membrane basale servirait de point d'ancrage et stabiliserait les microtubules.

## Importance de la dynamique des Microtubules

La découverte de la dynamique importante des microtubules a entraîné l'identification de substances modifiant celle-ci. Parmi ces composés citons le taxol, qui se lie aux microtubules et les stabilisent, ou le nocodazole, qui se lie aux sous unités de tubuline- $\beta$ , empêchant leur incorporation et provoquant la dépolymérisation des microtubules. Ces drogues, en modifiant les propriétés de l'instabilité dynamique des microtubules, ont permis d'étudier l'importance de la dynamique des microtubules dans de nombreux processus. Cette partie traite de l'importance de la dynamique des microtubules en mitose.

Lors de l'entrée en mitose la dynamique des microtubules change radicalement pour passer d'un état quasi quiescent en interphase à une dynamique très importante. Lors de la NEB l'ensemble des microtubules dépolymérisent. Les microtubules recommencent à polymériser au niveau des centrosomes (les centrioles ayant été dupliqués avant l'entrée

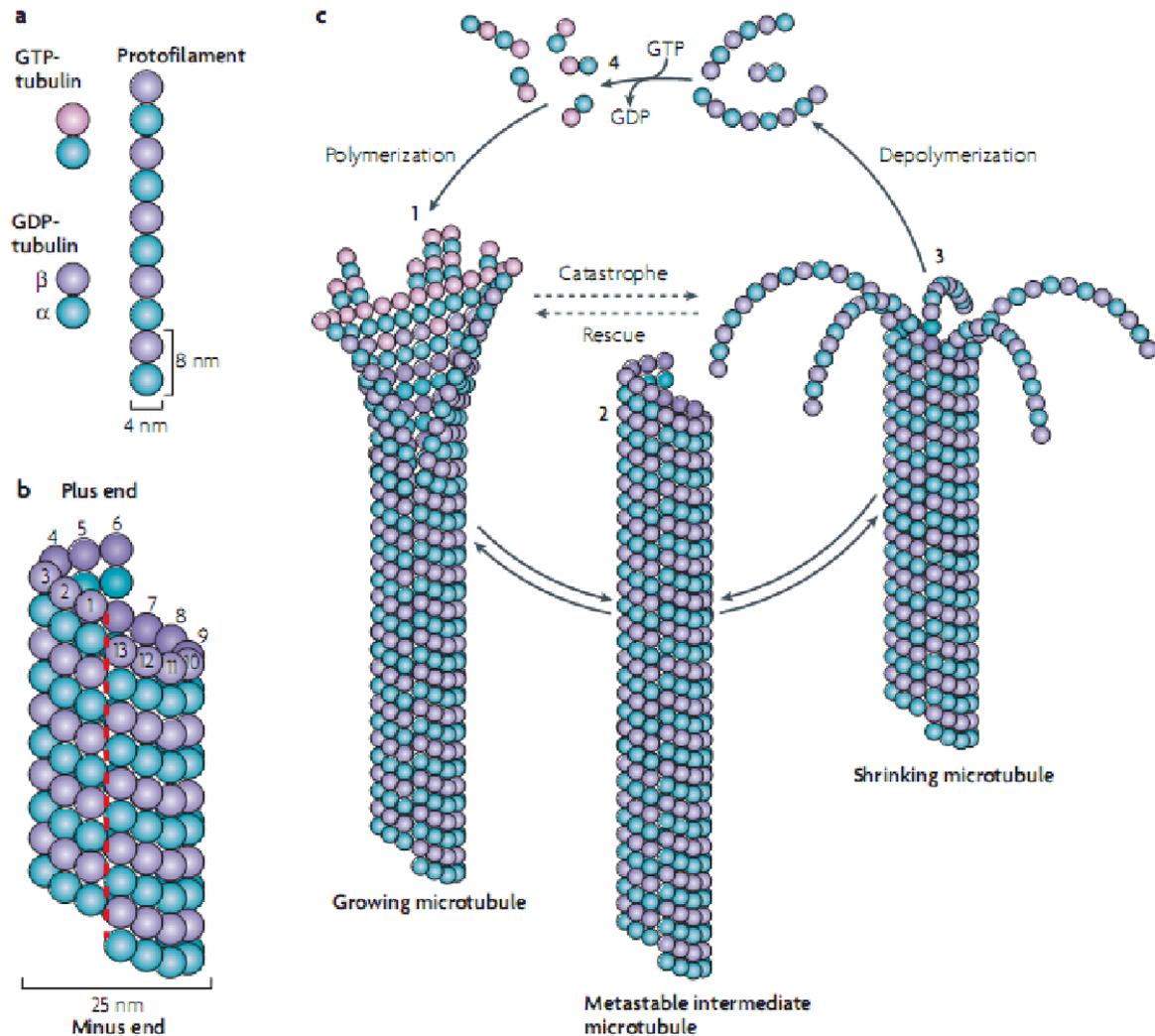


FIGURE 1.7 – Instabilité dynamique des Microtubules

Représentation d'un dimère de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ , et de l'assemblage en protofilament (a). Représentation d'un microtubule, constitué par l'assemblage de treize protofilaments, avec l'extrémité  $\oplus$  en haut et l'extrémité  $\ominus$  en bas (b). La partie c illustre l'instabilité dynamique d'un microtubule, celui-ci pouvant passer d'un état de polymérisation à une dépolymérisation par des mécanismes de sauvetage ou de catastrophe, ou rester dans un état stationnaire. D'après (Akhmanova & Steinmetz, 2008).

en mitose). Certains facteurs emprisonnés dans le noyau sont libérés à la NEB et peuvent participer à la régulation de la dynamique des microtubules ainsi qu'au processus permettant le développement d'un fuseau bipolaire. C'est le cas de la protéine NuMA qui est ségrégée dans le noyau en interphase. En prophase, les Microtubules qui polymérisent vers le noyau sont stabilisés le long de la membrane nucléaire par un processus dépendant de la dyneine/dynactine (Piehl & Cassimeris, 2003).

On distingue trois populations de microtubules en mitose : les microtubules kinétochoriens qui contactent les kinétochores, les microtubules du fuseau qui se chevauchent au niveau de la plaque métaphasique et les microtubules astériens qui vont contacter le

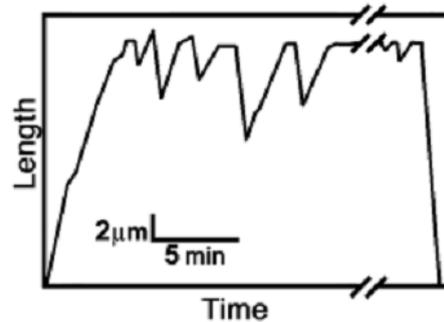


FIGURE 1.8 – Phase de polymérisation et de dépolymérisation d'un microtubule interphasique

Un microtubule polymérise à partir du MTOC sans subir d'évènements de catastrophe (partie gauche du graphique). Lorsque le microtubule arrive au niveau de la bordure cellulaire il subit une série d'évènements de catastrophe et de sauvetage (milieu du graphique) avant de dépolymériser complètement et sans sauvetage jusqu'au MTOC (partie droite du graphique). D'après (Komarova *et al.*, 2002a).

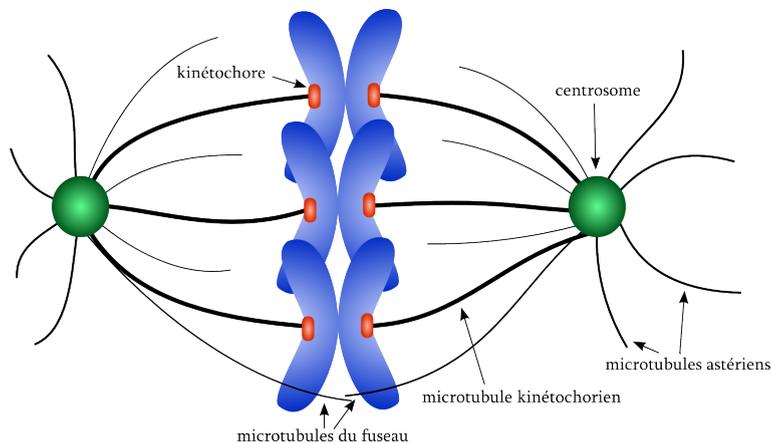


FIGURE 1.9 – Microtubules en mitose

Trois types de microtubules sont présents en mitose : les microtubules kinétochoriens qui connectent les kinétochores, les microtubules astériens qui polymérisent vers le cortex, et les microtubules du fuseau qui se chevauchent au niveau de la plaque métaphasique.

cortex (cf figure 1.9). Les microtubules en mitose ont une durée de vie très brève, de l'ordre de quelques minutes. Les microtubules astériens ont une durée de vie encore plus courte, de l'ordre de trente secondes. Il existe en mitose un flux de tubuline des kinétochores vers les pôles du fuseau. Des sous-unités de tubuline sont ajoutées au niveau des microtubules kinétochoriens, et un processus de dépolymérisation produit par l'activité d'enzymes 'microtubule dépolymérase' réduit la taille des microtubules aux pôles. Ceci crée un mouvement général de flux de type tapis roulant ('treadmilling') dirigé des chromosomes vers les pôles du fuseau. Des expériences utilisant des billes enduites d'ADN mises en présence de tubuline et de GTP ont montré que les chromosomes ont la propriété d'assembler les microtubules et même de générer un fuseau bipolaire en l'absence de centrosomes et de kinétochores (Heald *et al.*, 1996).

Une étude récente a relié la dynamique très importante des microtubules astériens au processus de génération de force. Le groupe de F. Nedelec a décrit le mode de contact des microtubules astériens avec le cortex chez *C. elegans*. Un microtubule qui contacte le cortex n'est pas stabilisé mais au contraire dépolymérise presque instantanément, le temps moyen de contact avec le cortex se situant entre 1 et 2 sec. Une autre observation particulièrement intéressante est la présence de mini-faisceaux de quelques microtubules. Au sein de cette fibre chaque microtubule possède sa dynamique propre, si bien que la dépolymérisation d'un microtubule individuel n'entraîne pas la dépolymérisation de l'ensemble des microtubules de la fibre. Au contraire les auteurs ont observé qu'un autre microtubule peut polymériser jusqu'à la membrane pendant qu'un autre microtubule de la fibre dépolymérise, et ainsi ré-établir un contact cortical au même endroit que le microtubule précédent. Ce mécanisme permet de générer une force sur le fuseau dirigée grâce à l'action de plusieurs microtubules, et ce même lorsqu'un microtubule individuel du faisceau dépolymérise (Kozłowski *et al.*, 2007).

Le groupe de C. Doe a montré l'importance des microtubules dans l'établissement de la polarité. Les microtubules contactent le cortex des neuroblastes et produisent un signal qui va enrichir à cet endroit un ensemble de protéines impliquées dans la division asymétrique (Siegrist & Doe, 2005). Les microtubules peuvent donc par eux-mêmes induire une polarité corticale. Ce mécanisme est détaillé dans la partie traitant du rôle de Pins dans l'orientation du fuseau dans le neuroblaste, page 34. Ces observations n'ont pas encore été réalisées dans des cellules de mammifères.

### Régulation de la dynamique des Microtubules par les +Tips

Les plus end tracking proteins (+TIPS) font partie de la famille des Microtubule Associated Proteins (MAPs) et sont impliquées dans la régulation de la dynamique des microtubules. On trouve parmi ces protéines EB1, CLIP-170 et CLIP-115, p150<sup>Glued</sup>, APC, CLASP1/2, MACF, Lis1, XMAP215, MCAK ou la Dynéine. La protéine EB1 augmente la polymérisation des microtubules en augmentant la fréquence de sauvetage et diminuant le taux de dépolymérisation ainsi que le temps passé en pause (Morrison *et al.*, 1998; Rogers *et al.*, 2002). Les protéines CLIP sont impliquées dans le sauvetage, en convertissant le bout  $\oplus$  d'un microtubule dépolymérisant en un bout polymérisant (Komarova *et al.*, 2002b). Les CLASPs sont généralement impliquées dans la stabilisation des microtubules (Galjart, 2005), de même qu'APC (Galjart, 2005). MCAK agit comme déstabilisateur des microtubules, promouvant leur dépolymerisation (Moores & Milligan, 2006). Un point important est la relation entre l'état post-traductionnel de la tubuline et l'association des MAPs. Il a en effet été observé que certaines MAPs s'associent aux microtubules préférentiellement lorsque la tubuline est tyrosinée, telles CLIP-115 et p150<sup>Glued</sup>. La modification post-traductionnelle de la tubuline se manifeste donc par un changement d'association de certaines MAPs, ce qui peut entraîner des conséquences pour l'orienta-

tion du fuseau. En effet dans des cellules présentant des microtubules Tyr- (par l'absence de la tubuline tyrosine ligase, TTL) les fuseaux ne sont plus capables de s'orienter en rapport avec la polarité corticale interphasique liée à l'adhésion sur un motif en forme de L (Peris *et al.*, 2006).

## 1.4 Les principaux modèles d'étude de la division

Le modèle de la première division de l'embryon *C. elegans*, de la division asymétrique de la cellule pI du Sensory Organ Precursor (SOP) (précurseur de l'organe mécanosensoriel) ou de la division asymétrique du neuroblaste chez *D. melanogaster* constituent des modèles de référence dans l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la division. Cette partie expose les modalités de la division dans ces modèles avant d'aborder dans la partie suivante les mécanismes moléculaires mis en jeu.

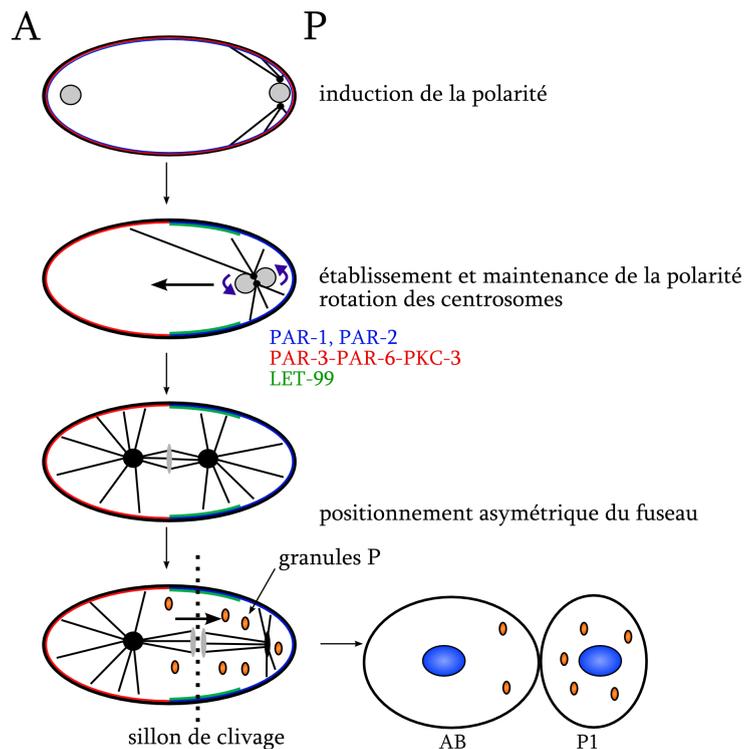
### 1.4.1 La première division de l'embryon *C. elegans*

La première division de *C. elegans* est un modèle couramment employé pour l'étude des mécanismes moléculaires de la division asymétrique. La première division de l'embryon est asymétrique par la composition en déterminants cellulaires des deux cellules filles mais également par la taille des deux cellules filles issues de cette division. En effet le sillon de clivage n'est pas centré et conduit à l'obtention de deux cellules filles de taille non équivalente. Plusieurs caractéristiques font de cet animal un modèle de choix en génétique et biologie du développement :

1. le développement de l'animal entier est reproductible et prédéterminé.
2. l'animal est transparent, l'observation du développement est possible par microscopie à lumière transmise.
3. le génome de *C. elegans* est séquencé.
4. la technique d'ARN interférent fonctionne chez *C. elegans* par l'utilisation de dsRNA.
5. il est possible de générer de grandes quantités de mutants par l'utilisation de mutagènes ou radiations.

La fertilisation de l'ovocyte par l'entrée du spermatozoïde va déclencher la méiose I et II de l'ovocyte, puis le début du développement après fusion des noyaux. Un processus de polarisation de l'ovocyte mature commence en relation avec le site d'entrée du spermatozoïde, un composant du spermatozoïde établissant le caractère postérieur de l'embryon. Les pronuclei ovocyte-spermatozoïde migrent vers le centre de l'oeuf, et les centrosomes s'alignent avec l'axe antéro-postérieur. Ceci marque le début de la première division mitotique de l'embryon.

Le fuseau est positionné centralement en métaphase et aligné selon l'axe antéro-postérieur (A-P). Durant l'anaphase le fuseau s'allonge de façon asymétrique à cause

FIGURE 1.10 – Première division dans l'embryon *C.elegans*

Le cortex de l'embryon acquiert une polarité suite à la localisation des protéines PAR, par des mécanismes d'exclusion réciproque couplés à un mécanisme d'induction de la polarité par les microtubules. Les asters s'orientent avec cet axe de polarité (antéro-postérieur) et le fuseau se positionne au milieu de l'embryon. Suite à l'action de générateurs de force corticaux l'aster postérieur est tiré vers le pôle postérieur, de même qu'il s'aplatit. Le fuseau est alors positionné asymétriquement. Cette division produit une cellule AB plus importante que la cellule P<sub>1</sub> postérieure. D'après (Ahringer, 2003; Gonczy, 2008)

de forces exercées sur le pôle postérieur, plus sollicité que le pôle antérieur. Une autre caractéristique de cette division est l'aplatissement de l'aster postérieur, qui traduit là encore une asymétrie de force exercée sur les asters. L'aster antérieur conserve une forme ronde pendant la durée de mitose. De plus les pôles du fuseau subissent des oscillations transversales à l'axe A-P, traduisant la présence de force agissant sur le fuseau. Les mouvements du pôle postérieur sont plus importants en terme d'amplitude d'oscillations. Ce comportement asymétrique des pôles est lié à une asymétrie des forces exercées sur les pôles (Grill *et al.*, 2001). Cette asymétrie de forces est la conséquence d'une différence numérique des générateurs de force corticaux, d'environ 50% plus nombreux au cortex postérieur (Grill *et al.*, 2003). Finalement le sillon de clivage, dont la position est dictée par le fuseau, est excentré et produit deux cellules de taille différente. Une cellule antérieure AB et une cellule postérieure P<sub>1</sub> plus petite (cf figure 1.10).

L'importance dans cette division des protéines PAR, G<sub>α</sub> et GPR-1/2/Ric-8 est discutée dans le paragraphe "Rôle des complexes moléculaires" page 17. L'importance de la dynamique des microtubules et du rôle de la dynéine avec LIN-5 est discutée dans le

paragraphe "Rôle de la Dynéine et LIN-5 chez C.elegans" page 39.

### 1.4.2 Le développement du SOP chez la drosophile

Le développement de l'organe mécanosensoriel externe de la drosophile se fait à partir du Sensory Organ Precursor. Le SOP, par une succession de division asymétriques entraînant une ségrégation asymétrique de Numb, produit un organe sensoriel composé de cinq cellules : une soie, un neurone, une cellule socle, une gaine, et une cellule gliale (cf figure 1.11).

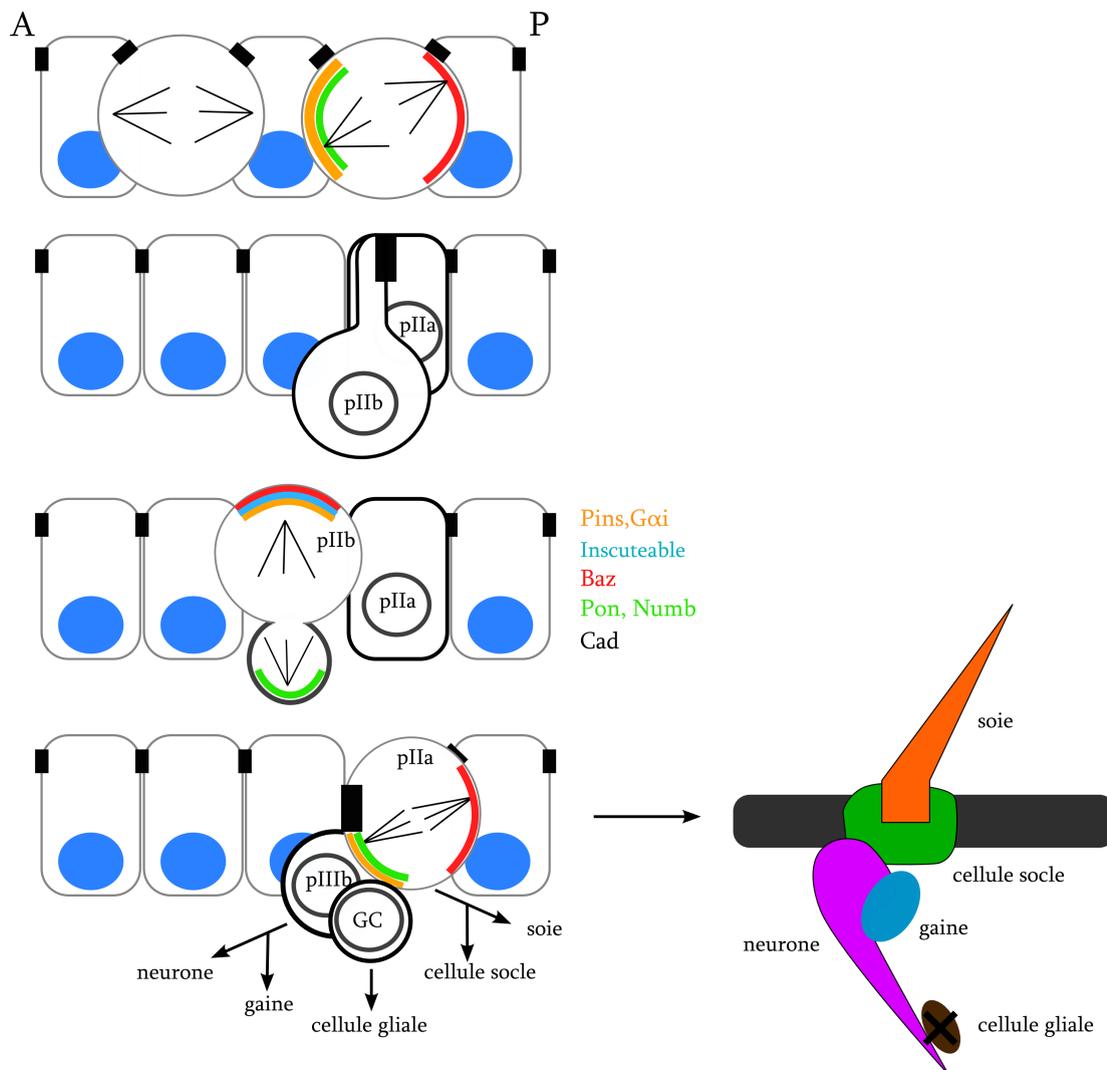


FIGURE 1.11 – Divisions du SOP

Divisions dans le SOP. La première division se fait selon l'axe antéro-postérieur. Suite à l'accumulation en un croissant de Pon/Numb au cortex antérieur le fuseau s'oriente avec cet axe. Le fuseau subit des mouvements de va-et-vient pendant l'accumulation en croissant. La cellule antérieure pIIb se divise asymétriquement suivant l'axe apico-basal pour donner la cellule pIIIb et la cellule gliale, qui hérite de Numb. La cellule pIIa se divise selon l'axe antéro-postérieur pour donner la cellule socle et la soie. La dernière division de la cellule pIIIb selon l'axe apico-basal donne la gaine et le neurone, qui hérite de Numb. D'après (Borgne *et al.*, 2002)

La première division du SOP produit une cellule antérieure pIIb et une cellule postérieure pIIa. La division de la cellule pIIb produit la cellule gliale, et une autre cellule pIIIb qui par division donne naissance au neurone et à la gaine. La division de la cellule pIIa produit la cellule socle et la soie. La première division du SOP est sous contrôle de la voie PCP, qui impose un axe de polarité global dans le plan de l'épithélium. L'orientation du fuseau se fait parallèlement au plan de l'épithélium, en relation avec la localisation polarisée de déterminants cellulaires. Le fuseau s'aligne avec la polarité corticale établie en interphase/prophase, et permet ainsi la ségrégation de déterminants cellulaires. Le fuseau présente des mouvements d'oscillations caractéristiques en relation avec un enrichissement cortical de protéines impliquées dans la division asymétrique, oscillations qui cessent au moment de l'entrée en anaphase (Roegiers *et al.*, 2001a). Cette division fait intervenir le récepteur transmembranaire Frizzled (Gho & Schweisguth, 1998), impliqué dans la transduction des voies Wnt canonique et Wnt/PCP (Vinson & Adler, 1987), Numb (découvert dans le SOP) (Knoblich *et al.*, 1995) et  $G_{\alpha i}$  (Schaefer *et al.*, 2001), Pins (Schaefer *et al.*, 2000), et les protéines PAR (l'homologue de PAR-3 chez la drosophile est Bazooka) (Bellaïche *et al.*, 2001b). La cellule pI possède une polarité apico-basale, mais sous l'action de Frizzled et de Pins cette cellule acquiert une polarité planaire, suivant l'axe antéro-postérieur. Cette polarité contrôle l'orientation du fuseau en relation avec la localisation corticale de complexes, et permet la ségrégation asymétrique de déterminants cellulaires. Cette polarité contrôle également l'alignement des deux pôles parallèlement au plan de l'épithélium. Cet alignement assure le maintien des deux cellules filles dans l'épithélium. Plus précisément les deux centrosomes ne sont pas exactement parallèles au plan de l'épithélium mais l'angle formé avec le plan est faible, régulé par l'action antagoniste de Frizzled localisé au pôle apical-postérieur et Pins/ $G_{\alpha i}$  à la membrane latérale-antérieure (cf figure 1.11 page précédente). La division de la cellule pIIb se fait perpendiculairement au plan de l'épithélium. Dans cette division le fuseau s'aligne également avec une polarité pré-établie, suivant un axe perpendiculaire au plan de l'épithélium et ressemble plus de ce fait à la division du neuroblaste.

### 1.4.3 Division du neuroblaste chez la drosophile

Le développement du système nerveux central chez la drosophile se fait à partir du neuroépithélium par division des neuroblastes. Cet épithélium est polarisé suivant l'axe apico-basal des cellules épithéliales.

Le neuroblaste délamine de l'épithélium avant d'entamer sa division. Ce système subit une division asymétrique qui produit un neuroblaste et une cellule plus petite en taille appelée *Ganglion Mother Cell* (**GMC**). La localisation au cortex apical et basal d'un ensemble de protéines crée un axe de polarité qui dicte l'orientation du fuseau. Le fuseau s'oriente perpendiculairement au plan de l'épithélium et produit une cellule plus importante en taille qui garde les propriétés du neuroblaste et la GMC. Cette GMC donne

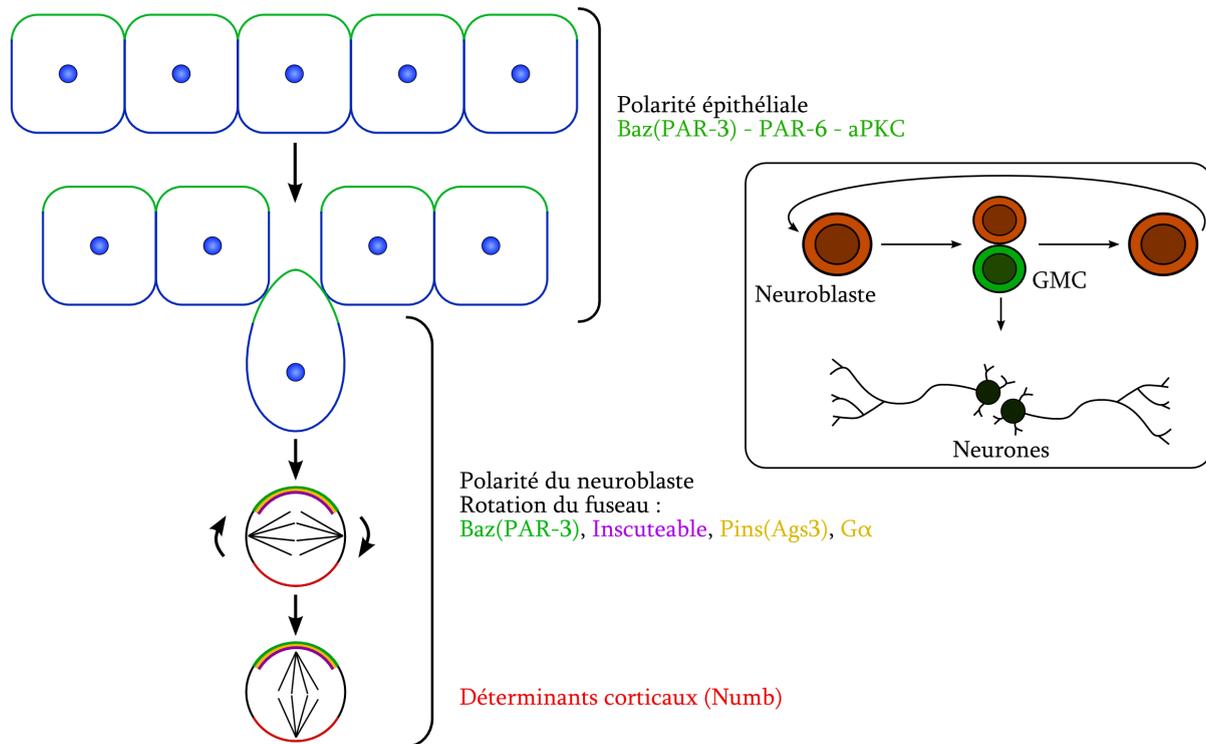


FIGURE 1.12 – Première division du neuroblaste

Avant la division le neuroblaste délamine du neuroépithélium. La localisation asymétrique de Pins/G $\alpha$ /Inscuteable au cortex apical oriente le fuseau selon cet axe de polarité apico-basal. La division asymétrique permet la ségrégation de Numb au pôle basal, la cellule en héritant, appelée *Ganglion Mother Cell* (**GMC**), donnant par une division suivante deux neurones. D'après (Ahringer, 2003; Knoblich, 2008)

deux neurones différenciés par une autre division (cf figure 1.12). La division asymétrique a pour conséquence la ségrégation des facteurs assurant le renouvellement du neuroblaste dans le neuroblaste, et des facteurs qui promeuvent la différenciation dans le GMC. Cette division implique les protéines PAR (Kuchinke *et al.*, 1998), Inscuteable (Kraut *et al.*, 1996), Pins et G $\alpha$  (Schaefer *et al.*, 2000), Miranda et Prospero (Ikeshima-Kataoka *et al.*, 1997), Numb et Pon (Kraut *et al.*, 1996).

#### 1.4.4 Un cas de division symétrique : les divisions symétriques de l'épithélium chez la drosophile

Les mécanismes moléculaires de la division sont étudiés principalement dans des systèmes de divisions asymétriques. Un cas de division symétrique bien décrit est celui de l'épithélium de drosophile. Dans ce système le fuseau s'aligne planairement au plan de l'épithélium, et conduit à une division symétrique. L'analyse de la ségrégation de *Partner Of Numb*, Pon, héritée par une cellule fille uniquement dans le cas de la division asymétrique du neuroblaste est ici répartie équitablement entre les deux cellules filles (Lu *et al.*, 2001). L'étude de mutants pour une protéine impliquée dans les jonctions adhérentes,

*crumbs*, a révélé l'importance de ces jonctions dans le contrôle des divisions symétriques. En effet dans ces mutants la ségrégation de Pon n'est plus équitable, ce qui conduit à une division asymétrique. De plus la situation est semblable pour Pon dans des mutants pour *APC-E*, un homologue particulier d'APC plus court (cf partie 'APC chez la Drosophile' page 50). En l'absence d'APC le fuseau s'oriente selon l'enrichissement basal de Bazooka et provoque une division asymétrique (Lu *et al.*, 2001). La localisation d'APC-2 (ou APC-E) aux jonctions adhérentes et son implication dans la régulation des divisions symétriques a été confirmée (McCartney *et al.*, 2001). Ces données sont cependant difficilement transposables aux cellules de mammifères au vu des spécificités de la protéine APC chez la drosophile (cf partie 'APC chez la Drosophile' page 50).

## 1.5 Rôles des complexes moléculaires

L'analyse de la division dans les trois systèmes décrits ci-dessus et dans les cellules de mammifères a permis de montrer le rôle capital joué par certains complexes moléculaires localisés au cortex. Ces complexes sont impliqués soit dans la localisation d'autres complexes au cortex soit dans le recrutement et la régulation des générateurs de force qui agissent sur le fuseau. La délimitation de domaines corticaux détermine *in fine* la polarité de la cellule, et contrôle l'orientation du fuseau. Ce chapitre traite des complexes majeurs que sont les protéines PAR,  $G_{\alpha i}$ , GPR-1 et 2/Pins/LGN et Ric-8, LIN-5/Mud/NuMA identifiés chez *C.elegans*, la Drosophile et les mammifères. L'importance de la contribution des microtubules astériens, de l'adhésion et de la signalisation dépendante des intégrines est également abordée.

### 1.5.1 Les protéines PAR : protéines clés dans l'établissement de la polarité

Les protéines PAR (pour *partition defective*) ont été caractérisées dans une étude exhaustive de mutants chez *C.elegans*. Cette étude visait à identifier des mutations létales par effet maternel, impliquées dans la ségrégation de déterminants cellulaires et donc nécessaires d'une façon générale au développement de l'embryon (Goldstein & Macara, 2007). Cette étude a permis d'identifier six gènes *par*, *par-1* à *6*, nommés ainsi en raison de problème de ségrégation 'partition defective' en anglais) de déterminants cellulaires (Kemphues *et al.*, 1988). D'une façon générale ces gènes sont impliqués dans l'organisation cytoplasmique de l'embryon, le positionnement et l'orientation du fuseau mitotique, ainsi que la localisation asymétrique d'un ensemble de protéines et ARN importants dans les décisions de destin cellulaire. L'importance des gènes *par* dans les processus de polarisation de l'embryon fait que les gènes *par* sont considérés comme des gènes maîtres dans la polarisation.

## Localisation asymétrique des protéines PAR

**C. elegans** Suite à l'entrée du pronucleus mâle une vague de contraction du cortex d'actomyosine se propage vers le pôle antérieur et polarise l'embryon. Par transport passif couplé à la propagation de l'onde de contraction ou un échange dynamique avec cette vague de contraction les protéines PAR-3, PAR-6 et une protéine kinase atypique, PKC-3, se retrouvent localisées au cortex antérieur. Les protéines PAR-1 et PAR-2 vont alors s'associer au cortex postérieur qui est libéré des protéines PAR-3 et PAR-6. Les protéines PAR-3 et PAR-6 sont donc localisées au cortex antérieur. Cette localisation asymétrique est capitale pour le déroulement correct de la mitose et la juste répartition des déterminants cellulaires.

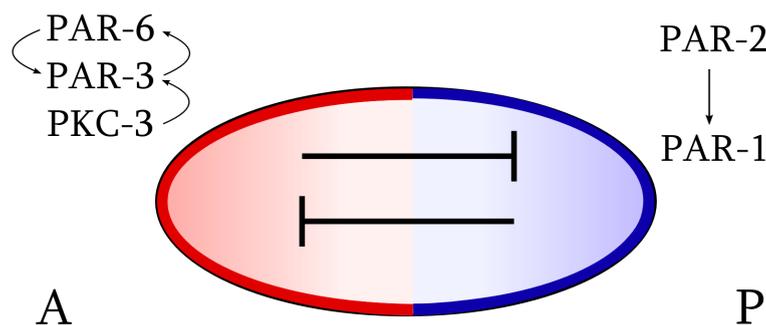


FIGURE 1.13 – Localisation des protéines PAR dans l'embryon une cellule *C.elegans*

L'exclusion mutuelle des complexes PAR-6/PAR-3 et PAR-2/PAR-1 permet de conserver l'asymétrie des domaines corticaux définis. D'après (Goldstein & Macara, 2007)

Des mécanismes d'auto-exclusion entre protéines PAR vont permettre de maintenir cette asymétrie. La phosphorylation de PAR-2 par PKC-3 au pôle antérieur empêche son association au cortex, et la présence de PAR-2 au cortex postérieur empêche l'association corticale de PAR-3/PAR-6/PKC-3, de façon PAR-1 et PAR-5 dépendante (cf figure 1.13). Le modèle général montre donc un processus de polarisation impliquant l'établissement des territoires antérieur et postérieur, puis le maintien de ces territoires par exclusion mutuelle des complexes PAR. Les protéines PAR-3, PAR-6 et PKC-3 fonctionnent dans un complexe, chacune étant nécessaire à la localisation corticale des deux autres. La protéine PAR-2 agit en aval de PAR-3/PAR-6, ces protéines étant correctement localisées dans le mutant *par-2*. Au pôle postérieur, PAR-2 permet l'accumulation de PAR-1.

**Drosophile** Les protéines PAR sont aussi localisées asymétriquement dans les modèles du neuroblaste et du SOP.

**Neuroblaste** La différence de destin cellulaire entre le neuroblaste et le GMC chez la drosophile provient d'une ségrégation asymétrique de déterminants cellulaires au cours de la mitose. Cette ségrégation a lieu grâce à l'alignement correct du fuseau avec un axe

de polarité établi avant la mitose. L'établissement de cette polarité est en partie sous le contrôle du complexe de protéines PAR (PAR-3/PAR-6/aPKC). Ce complexe Bazooka (l'homologue chez la Drosophile de PAR-3)/ DmPar-6 (PAR-6)/aPKC est déjà localisé au pôle apical dans le neuroépithélium à partir duquel délamine le neuroblaste. En mitose les protéines Inscuteable, PINS et Mud (l'homologue fonctionnel de NuMA) s'accumulent au pôle apical. Cette localisation apicale permet la localisation basale des déterminants cellulaires. La protéine Numb, protéine impliquée dans la répression de la voie Notch, identifiée initialement dans le SOP, de même que Prospero (un facteur de transcription) et Brat sont ainsi localisées basalement. La localisation des ces trois facteurs dépend des protéines adaptatrices Miranda, qui médie la localisation basale de Pros et Brat, et de Pon qui n'est pas strictement nécessaire à la localisation asymétrique de Numb mais y contribue (cf figure 1.14 page suivante). La localisation apicale de Bazooka et DmPar-6 est interdépendante : en l'absence de DmPar-6, Bazooka ne s'associe pas à la membrane apicale, et la surexpression de Bazooka entraîne une localisation ectopique de DmPar-6. De plus les cellules dans les mutants *DmPar-6* perdent leur polarité apico-basale, les divisions asymétriques sont mal orientées ce qui provoque une ségrégation incorrecte de Numb et Miranda dans la cellule fille basale. De même dans les mutants *Pins* la plupart des autres protéines sont délocalisées et ceci génère des problèmes de ségrégation lors de la mitose (Yu *et al.*, 2002). Ces protéines sont conservées entre espèces, l'homologue de Pins chez la souris étant capable de remplir les fonctions de Pins chez la drosophile (Yu *et al.*, 2003).

**Sensory Organ Precursor** La première division est sous le contrôle de la polarité planaire. Le récepteur Frizzled fonctionne de manière redondante à Pins pour l'exclusion du pôle antérieur de Bazooka. Par conséquent Bazooka s'organise en un croissant au cortex postérieur de la cellule pI en division. Bazooka est localisée asymétriquement durant la division de la cellule pI ainsi que dans les divisions suivantes (Roegiers *et al.*, 2001b). Les mutants *frizzled* ou *dishevelled* présentent une orientation aléatoire des fuseaux dans la cellule pI (Gho & Schweisguth, 1998). Pon est localisé au pôle antérieur de la cellule avec Numb (Roegiers *et al.*, 2001a). DaPKC montre une localisation similaire (Bellaïche *et al.*, 2001a).

Le fuseau dans le SOP fait des mouvements de va-et-vient ("seesaws") pendant la métaphase rappelant le comportement du fuseau en anaphase dans *C.elegans* (Roegiers *et al.*, 2001a)(cf figure 1.11 page 14). Frizzled est nécessaire à la localisation correcte de Numb et Pon en un croissant au cortex antérieur et donc leur ségrégation dans la cellule pIIb (Bellaïche *et al.*, 2001b). Une grande différence entre le SOP et le neuroblaste tient dans l'absence de l'expression de Inscuteable dans la cellule pI du SOP, mais Inscuteable est indispensable pour la division de la cellule pIIb du SOP dont le mode de division rappelle celui du neuroblaste. Une autre différence avec le neuroblaste tient dans l'absence

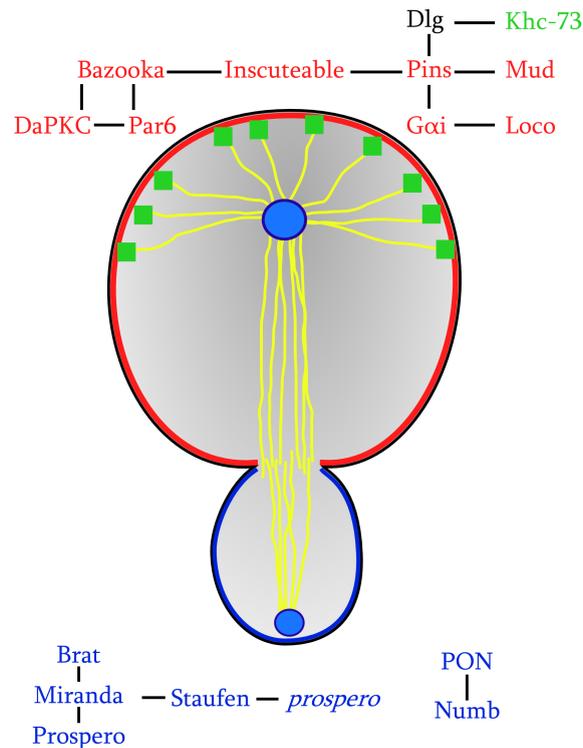


FIGURE 1.14 – Localisation des protéines PAR et déterminants cellulaires dans le neuroblaste chez la drosophile

Le pôle apical est en haut, le pôle basal en bas. La protéine Par6 forme un complexe avec les protéines Bazooka/Par3 et DaPKC. Un deuxième complexe moléculaire comprenant  $G_{\alpha i}$ , Pins, et Loco régit l'orientation du fuseau mitotique de façon à contrôler l'orientation du sillon de clivage (perpendiculairement à l'axe de polarité). Pins peut également s'associer à Mud, nécessaire à l'orientation du fuseau, ainsi qu'à Dlg et Khc-73, pour induire une polarité corticale. Deux types de complexe sont localisés au cortex basal. Un complexe comprenant la protéine adaptatrice Miranda qui s'associe à Brat (Brain Tumor), le facteur de transcription Prospero et la protéine Staufen qui peut interagir avec le transcript de *prospero*. Un second complexe contenant Numb, l'antagoniste de Notch, et son partenaire Pon (Partner of Numb). Numb, Prospero et Brat ségrègent dans la cellule fille GMC où ils promeuvent la différenciation et suppriment la capacité de renouvellement de cette cellule. La division asymétrique du neuroblaste implique également une asymétrie de taille des cellules, de même que le centrosome apical est apte à organiser la polymérisation des microtubules plus tôt que le centrosome basal, et possède une activité de nucléation plus importante. D'après (Zhong & Chia, 2008)

de localisation de Pins avec Bazooka, à l'inverse Pins est co-localisée au cortex antérieur avec Numb,  $G_{\alpha i}$  et *Discs Large*, Dlg (une protéine interagissant avec APC, cf partie "APC et la polarité" page 49) (Bellaïche *et al.*, 2001b). Un point intéressant est la relocalisation des protéines en mitose. Ainsi les protéines dmPar6 et aPKC localisées au dessus des jonctions adhérentes sont relocalisées le long de la membrane latérale. Cette relocalisation fait suite à la signalisation PCP dépendante de Wnt qui impose une polarité planaire à une cellule possédant une polarité apico-basale. Ceci montre la capacité de cette voie à utiliser des éléments déjà présents pour imposer une polarité différente (cf figure 1.15

page suivante).

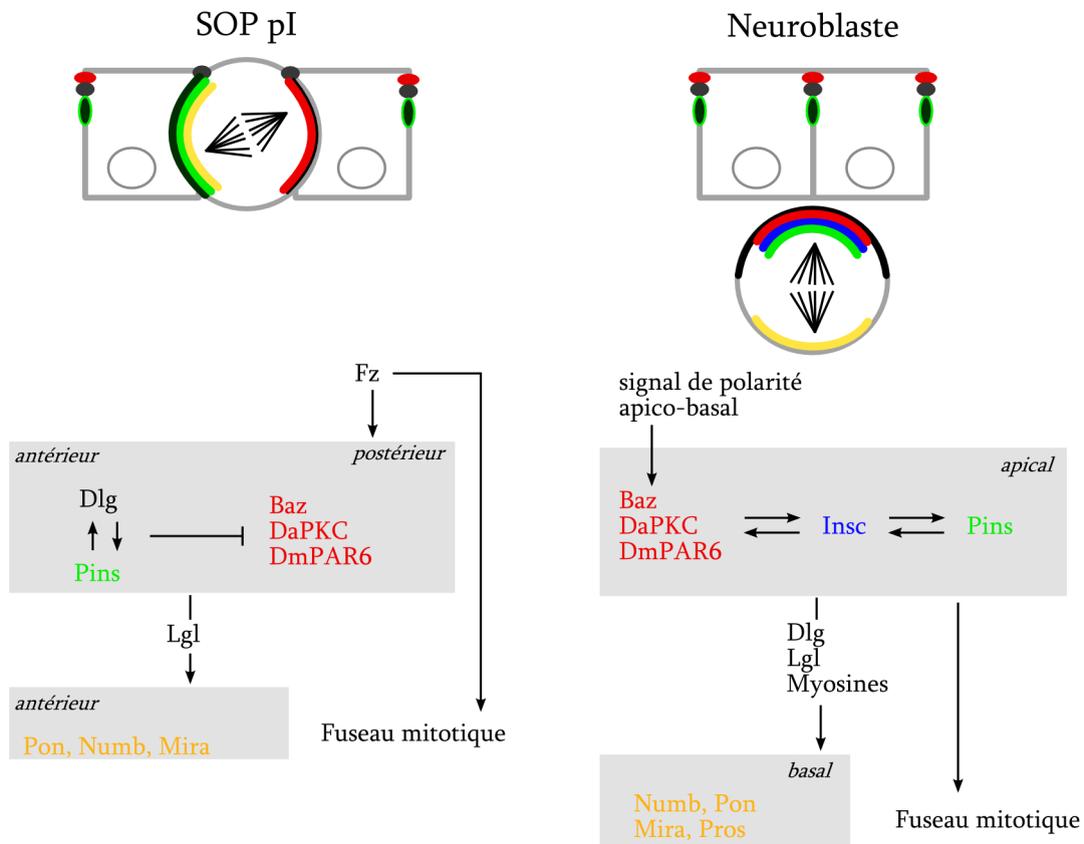


FIGURE 1.15 – Localisation des complexes Pins/ $G_{\alpha i}$  et Baz/Par-6/aPKC dans la cellule pI et le Neuroblaste chez la drosophile

Localisation des complexes Pins et des protéines PAR dans la cellule pI de SOP et parallèle avec le neuroblaste. Dans l'embryon sauvage l'activité de Frizzled localisé apicalement au pôle postérieur et de Pins/ $G_{\alpha i}$  au cortex antérieur contrôle l'alignement du fuseau dans le plan de l'épithélium, le fuseau formant un angle faible par rapport au plan de l'épithélium. Pour une description plus précise de la situation dans la cellule pI consulter la figure 1.11 page 14. D'après (Bellaïche *et al.*, 2001b; Segalen *et al.*, 2006)

## Rôle des protéines PAR dans le positionnement et l'orientation du fuseau

**C.elegans** Le rôle des protéines PAR a été montré par l'étude du comportement du fuseau et la localisation de protéines importantes dans les mécanismes d'orientation-positionnement du fuseau dans les mutants *par*. Cette partie ne traite que des conséquences sur le positionnement et l'orientation du fuseau de mutations dans les gènes *par*. Les protéines impliquées dans la régulation des générateurs de force, sous contrôle des protéines PAR, seront décrites plus loin.

Des expériences de mesures de force par quantification de la vitesse des pôles après rupture de la zone centrale du fuseau ont montré que les mutants *par-2* et *par-3* n'ont plus d'asymétrie de forces exercées sur les pôles. L'utilisation d'un laser afin de micro-disséquer la partie centrale du fuseau sans toucher aux centrosomes permet de mesurer la

vitesse des pôles libérés de la tension exercée par les microtubules kinétochoriens et polaires. Cette mesure de vitesse de déplacement des pôles représente une mesure des forces agissant sur les pôles (Grill *et al.*, 2001; 2003). Ces expériences ont permis de montrer une asymétrie de forces exercées sur le fuseau (cf partie ‘La première division de l’embryon *C.elegans*’ page 12). Ce type d’expérience est rendu possible chez *C.elegans* par l’absence de check-point sur l’assemblage du fuseau lors des premières divisions. Dans le mutant *par-2* PAR-3 s’étend jusqu’au pôle postérieur et le cortex acquiert une identité ‘antérieure’, alors que dans le mutant *par-3* PAR-2 s’étend jusqu’au pôle antérieur et le cortex acquiert une identité ‘postérieure’. Les pôles après rupture du fuseau dans le mutant *par-2* subissent des forces inférieures à la normale, alors que les forces exercées sur les pôles sont plus importantes dans les mutant *par-3* (Grill *et al.*, 2001). Dans la situation où le cortex est antériorisé (mutant *par-2*) les pôles subissent des forces équivalentes à celle du pôle antérieur dans une situation normale. Dans la situation où le cortex est postériorisé (mutant *par-3*) les pôles subissent des forces équivalentes à celle du pôle postérieur de la situation normale. Les protéines PAR sont donc impliquées dans l’asymétrie des forces exercées sur le fuseau. Il semble peu probable que les protéines PAR agissent directement en tant que générateurs de force sur le fuseau. A l’inverse, les protéines PAR sont importantes pour l’établissement de domaines corticaux, le recrutement et la régulation de générateurs de force impliquées dans les mouvements du fuseau. Un des grands défis est de comprendre comment ces asymétries de localisation corticales sont transmises au fuseau.

**Drosophile** Bazooka n’est pas nécessaire dans l’orientation du fuseau dans le SOP mais nécessaire pour la localisation asymétrique de déterminants cellulaires, parmi lequel Numb (Roegiers *et al.*, 2001b). Très récemment un lien entre l’homologue de Par-4 chez la *Drosophile*, *dlkb1* (homologue de Lkb1 humain), et la régulation de la division asymétrique du neuroblaste a été établi. Des mutations dans *dlkb1* suppriment la cytokinèse inégale, la localisation de Bazooka, Miranda, aPKC et Par-6 est affectée mais pas l’orientation du fuseau (Bonaccorsi *et al.*, 2007). En effet les localisation de Pins et  $G_{\alpha i}$  ne sont pas affectées, suggérant que Pins fonctionne parallèlement pour assurer la polarité.

## 1.6 Régulation des complexes moléculaires impliqués dans la génération de force

Nous avons vu dans la partie précédente l’importance des gènes *par* dans l’établissement de la polarité chez *C. elegans* et la *drosophile*. Ce chapitre traite de quelques uns des complexes contrôlés par les protéines PAR et impliqués dans la régulation des générateurs de force. Le terme ‘générateur de force’ désigne les complexes moléculaires qui vont établir un lien entre les microtubules astériens et le cortex, et influencer sur le

comportement du fuseau par la transmission de force au fuseau. Les générateurs de force sont *a priori* activés et régulés par des signaux corticaux. Il faut également envisager la possibilité d'un apport des régulateurs par les microtubules astériens eux-mêmes, ceux-ci pouvant imposer une polarité (Siegrist & Doe, 2005; 2007).

La génération de forces sur le fuseau implique un ensemble de protéines, et une description séquentielle du rôle de ces protéines rend peu compte des connexions entre ces complexes. Le modèle de cellules de mammifères est décrit en premier, le rôle de NuMA et LGN y étant relativement bien compris. Le rôle du complexe  $G_{\alpha i}$ , ancrés à la membrane et élément central dans la régulation des forces appliquées au fuseau, et régulé par GRP-1/2 et Ric-8 est montré à travers les modèles *C. elegans* et *Drosophile*. Le rôle de Mud dans le contrôle de l'alignement planaire chez le SOP de *drosophile* est décrit, et enfin le rôle de LIN-5 associée à la Dynéine, impliquées dans la génération de forces est détaillé.

Les protéines G semblent jouer un rôle central dans les processus de positionnement et d'orientation du fuseau. En effet bon nombre des protéines décrites ci-après ont soit une action directe dans la régulation de l'activité des protéines G ou sont soit impliquées dans la liaison et la formation de complexes incluant les protéines G. Le cycle classique des protéines G est décrit ci-dessous.

### 1.6.1 Les protéines $G_{\alpha i}$ dans la régulation des générateurs de force

Des expériences utilisant la technique d'inactivation par ARN interférent, des mutants pour les protéines G, ou des drogues inhibant les protéines G ont permis de montrer leur importance dans la génération de force chez *C. elegans*, la *Drosophile* et les cellules de mammifères.

#### Cycle des protéines G

Les protéines G sont des protéines trimériques formées par l'assemblage des sous unités  $G_{\alpha}$ ,  $G_{\beta}$  et  $G_{\gamma}$ . Ces protéines sont généralement associées à un récepteur, et alternent entre un état actif lié au GTP et un état inactif lié au GDP. Le modèle classique de la signalisation par les protéines G trimériques est celui de la signalisation par un récepteur couplé à une protéine G (**GPCR**). Dans ce modèle la protéine  $G_{\alpha}$  est couplée aux sous-unités  $G_{\beta\gamma}$  qui empêche le largage du GDP. Les sous-unités  $G_{\beta\gamma}$  ont donc une activité *Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor* (**GDI**) sur la sous-unité  $G_{\alpha}$ . Suite à la liaison d'un ligand sur le récepteur celui-ci agit comme un *Guanine nucleotide Exchange Factor* (**GEF**) en promouvant le largage du GDP, ce qui facilite la liaison d'une molécule de GTP, et la dissociation subséquente des sous-unités  $G_{\beta\gamma}$ . La sous-unité  $G_{\alpha}$  et le

complexe  $G_{\beta\gamma}$  vont alors pouvoir interagir avec leurs effecteurs, parmi lequel l'adenylylate cyclase, la phospholipase C et certains canaux ioniques. La sous-unité  $G_{\alpha}$  possède une activité *Guanosine TriPhosphatase* (**GTPase**) qui hydrolyse le GTP en GDP, cette activité étant fortement stimulée par une classe de protéines, les protéines *Regulator of G protein Signalling* (**RGS**), qui agissent comme *GTPase-Activating Protein* (**GAP**) sur la sous-unité  $G_{\alpha}$  (Kimple *et al.*, 2002). Les homologues des protéines entre *C. elegans*, *D. melanogaster* et les mammifères sont indiqués dans le tableau 1.1.

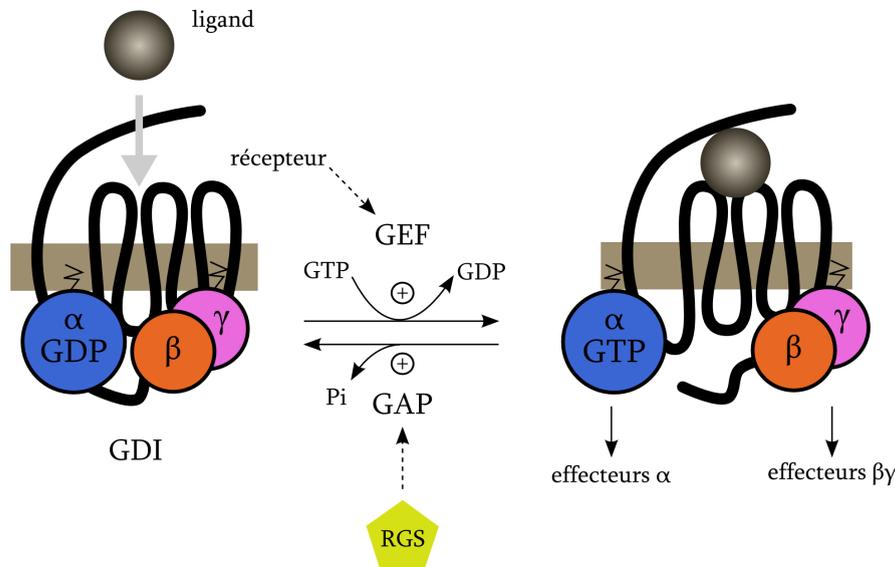


FIGURE 1.16 – Signalisation par un récepteur couplé à une protéine G

Suite à la liaison d'un ligand sur le récepteur, celui-ci agit comme **GEF** sur la protéine G en activant l'échange de GDP contre du GTP sur la sous-unité  $\alpha$ . Les sous-unités  $\beta$   $\gamma$  et  $\alpha$  sont alors libres d'interagir avec leurs effecteurs. Des protéines peuvent agir sur l'activité GTPasique de la sous-unité  $\alpha$ , ces protéines à activité **GAP** accélèrent l'hydrolyse du GTP en GDP, ce qui conduit à la réassociation des sous-unités  $\beta$   $\gamma$  à  $\alpha$  et à l'inhibition de la signalisation. D'après (Kimple *et al.*, 2002)

	<b>C. elegans</b>	<b>D. melanogaster</b>	<b>Mammifères</b>
$G_{\alpha i/o}$	GOA-1, GPA-16	$G_{\alpha i}$	$G_{\alpha i}$
<b>PINS</b>	GPR-1/2	Pins	LGN, AGS3
<b>NuMA</b>	LIN-5	Mud	NuMA

TABLE 1.1 – Homologue chez *C. elegans*, *Drosophile* et Mammifères

Ce tableau résume les homologues chez *C. elegans*, *D. melanogaster* et chez les mammifères des principaux complexes décrit ci-après. Ne figure pas dans ce tableau Ric-8 dont le nom est conservé parmi ces espèces.

## 1.6.2 Les protéines G chez les mammifères : connection avec le fuseau et NuMA via LGN

### Modèle général de régulation des forces exercées sur le fuseau

De façon très schématique le mécanisme d'orientation du fuseau repose sur l'activation et la régulation des protéines G par des **GEF** et **GDI**. Le mécanisme d'activation des protéines G durant les divisions expliquées ci-après est très particulier car ne fait pas intervenir un récepteur. Il s'agit donc d'un mécanisme récepteur indépendant. Les protéines G, sous leur forme GDP vont alors soit directement soit en collaboration avec la Dynéine exercer une force sur le fuseau. Il y a plusieurs 'niveaux' dans ce processus, entre d'une part des protéines localisées au cortex, impliquées soit dans la polarité soit dans la production de force, des protéines régulatrices, et enfin des protéines assurant le lien vers les microtubules astériens, jouant le rôle de transmetteurs. Le mécanisme peut se décomposer entre d'une part une polarité qui dicte l'orientation du fuseau, et d'autre part des mécanismes qui vont réguler la dynamique des microtubules et leur contact avec le cortex et qui vont orienter le fuseau par rapport à cette polarité.

→ **La protéine LGN sert d'interrupteur moléculaire dans la liaison du fuseau et NuMA au cortex et  $G_{\alpha i}$**

La protéine LGN (l'homologue mammifère de Pins) possède quatre domaines GoLoco pour  $G_{\alpha i/o}$ -Loco "interaction motif" (Siderovski *et al.*, 1999), et sept domaines TPR. Les protéines à domaine GoLoco se lient préférentiellement aux  $G_{\alpha}$  dans leur forme GDP, et inhibent le largage du GDP. Les motifs GoLoco fonctionnent ainsi comme des **GDI** sur les sous-unités  $G_{\alpha}$  (Kimple *et al.*, 2002). En mitose LGN est principalement localisée au fuseau et joue un rôle majeur dans le maintien d'un fuseau bipolaire (Du *et al.*, 2001). En effet la diminution du taux de LGN par ARN interférent induit des perturbations de l'organisation du cytosquelette de microtubules en mitose, avec la présence de plusieurs asters et des micro-noyaux dans certaines cellules. Ce rôle de LGN implique son interaction avec NuMA, une protéine clé dans la régulation du cytosquelette des microtubules en mitose et dans l'assemblage du fuseau. En effet NuMA participe au maintien des extrémités  $\ominus$  des microtubules aux pôles, contribuant au maintien d'un fuseau bipolaire. La protéine NuMA n'est plus localisée aux pôles dans les cellules traitées à l'ARN interférent contre LGN.

LGN joue cependant un autre rôle important en mitose. En effet une localisation corticale de LGN est décrite dans certaines lignées cellulaires telles les cellules NRK (Kaushik *et al.*, 2003) ou MDCK (Du & Macara, 2004). Une localisation asymétrique de LGN en mitose a été reportée dans des cultures de cellule neuronale progénitrice humaine (hNPC) (Fuja *et al.*, 2004), ainsi que dans les divisions asymétriques des cellules de l'épiderme (Lechler & Fuchs, 2005). Cette localisation suggère un rôle dans l'orientation du fuseau. Récemment le rôle de LGN dans l'orientation du fuseau a ainsi été montré dans

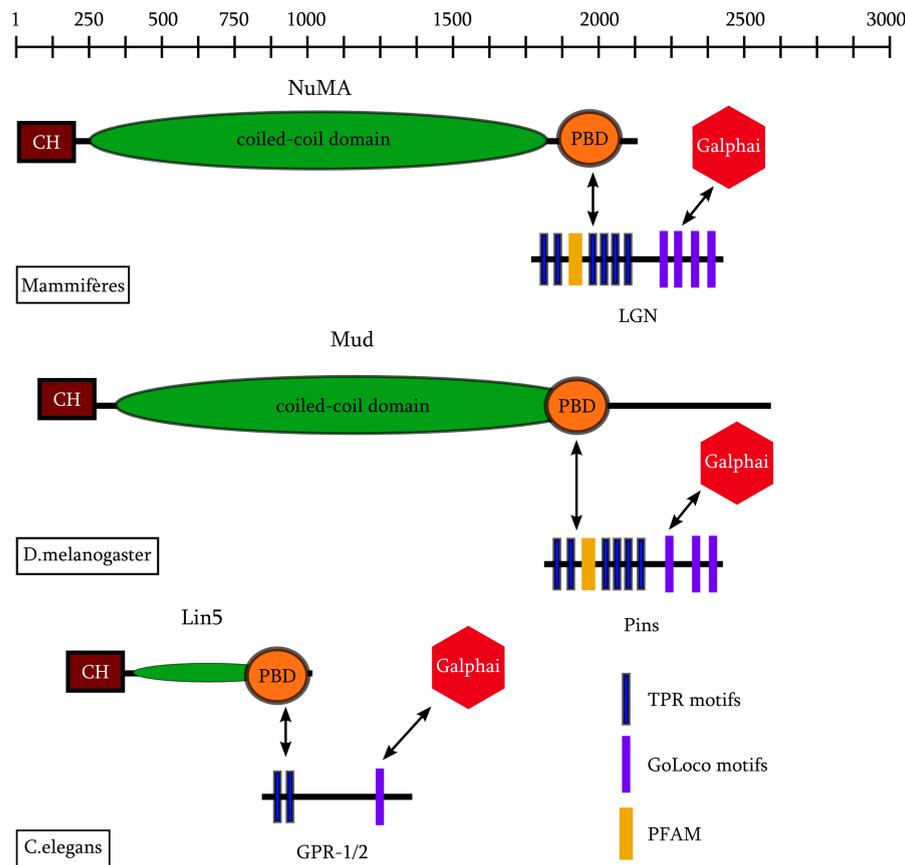


FIGURE 1.17 – Principales protéines décrites dans l'orientation du fuseau

Les trois complexes chez les mammifères, *D. melanogaster* et *C. elegans* impliqués dans la régulation des forces exercées sur le fuseau. Dans chacun de ces complexes une protéine (LGN, Pins ou GRP-1/2) lie une protéine impliquée dans l'organisation du fuseau (NuMA, Mud ou Lin5) à  $G_{\alpha i}$ .

CH : Calponin Homology ; PBD : Pins Binding Domain ; PFAM : Protein Family. L'échelle en haut de la figure indique la taille des protéines en nombre d'acide aminés. D'après (Kimple *et al.*, 2002; Srinivasan *et al.*, 2003; Fuja *et al.*, 2004; Bowman *et al.*, 2006; Nipper *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2007)

le contrôle des divisions symétriques du neuroépithélium. Le contrôle de l'orientation est capital dans le maintien de la population de cellules neuroépithéliales. Le rôle de LGN dans ce contexte est de contrôler l'orientation des divisions de façon à maintenir les cellules neurales progénitrices dans le neuroépithélium et d'assurer ainsi le développement correct du système nerveux (Morin *et al.*, 2007; Konno *et al.*, 2008).

Malgré son rôle dans les divisions du neuroépithélium il semble peut probable que LGN dicte l'orientation du fuseau. Des données indiquent que LGN est une protéine importante dans la formation de complexes impliqués dans l'orientation. En effet LGN peut en plus de sa liaison à NuMA se lier à  $G_{\alpha i}$ , et ainsi former un complexe LGN- $G_{\alpha i}$ -NuMA en mitose (cf figure 1.18 page suivante). LGN peut exister également dans certaines conditions au sein d'un complexe contenant mInsc, l'homologue humain de Inscuteable, et Par-3, dans les cellules épidermales par exemple (Lechler & Fuchs, 2005). L'interaction de LGN avec les protéines G suggère donc un mécanisme de connexion entre le fuseau et le cortex.

Le rôle des protéines G en mitose est encore relativement peu connu dans les cellules de mammifères. A ce jour aucune étude n'a reporté les conséquences de la diminution d'expression de  $G_{\alpha i}$  en mitose. Récemment la localisation de  $G_{\alpha i3}$  au cortex de cellules CHO en mitose a été reportée, de même qu'une augmentation importante de la taille du fuseau et donc une diminution de la distance des pôles à la membrane dans des cellules surexprimant LGN et  $G_{\alpha i3}$  (Blumer *et al.*, 2006). Ceci suggère soit une régulation de la taille du fuseau (la Dynéine apporte NuMa et d'autres protéines aux pôles du fuseau qui vont y réguler la dépolymérisation des microtubules) et/ou une augmentation des forces exercées sur les pôles via les microtubules astériens. De plus il a été montré que la surexpression de  $G_{\alpha i}$  ou LGN entraîne une augmentation importante des mouvements du fuseau dans les cellules MDCK (Du & Macara, 2004). Dans ces mêmes cellules le marquage de NuMA est plus important à la membrane. Ces données démontrent la capacité de  $G_{\alpha i}$  à assembler à la membrane des complexes (dont NuMA) impliqués dans la régulation des forces. En effet la présence de mouvements importants dans les cellules transfectées par la construction  $G_{\alpha i}$ -YFP repose sur la localisation correcte de  $G_{\alpha i}$  à la membrane, la surexpression d'une forme  $G_{\alpha i}$ -RFP ne pouvant se localiser à la membrane ne provoquant aucun mouvement du fuseau (Du & Macara, 2004).

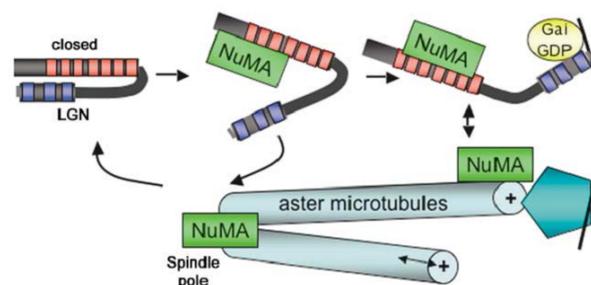


FIGURE 1.18 – Formation du complexe NuMA/LGN/ $G_{\alpha i}$  en mitose

En interphase LGN est dans une conformation repliée par l'interaction intramolécule des parties  $N_{ter}$  et  $C_{ter}$ . En mitose, NuMA est libérée du noyau et se fixe sur LGN. Ceci produit un changement de conformation qui ouvre LGN. LGN peut alors interagir avec  $G_{\alpha i}$  localisée au cortex. Ce mécanisme permet de former un complexe NuMA/LGN/ $G_{\alpha i}$  au cortex. D'après (Du & Macara, 2004)

NuMA pour *nucleus and mitotic apparatus* possède un domaine de liaison à LGN, un domaine de liaison aux microtubules, et une séquence NLS. NuMA est localisée dans le noyau en interphase. En mitose NuMA est localisée aux asters et participe à l'organisation bipolaire du fuseau en concentrant les bouts  $\ominus$  des microtubules (Merdes *et al.*, 1996; Fant *et al.*, 2004). Il est important de noter que NuMA en mitose peut s'associer avec la dynéine et la dynactine (Merdes *et al.*, 1996). Le groupe de I. Macara s'est attaché à comprendre les relations entre NuMA, LGN et la protéine  $G_{\alpha i}$  en mitose. Par des expériences de FRET *in vivo* et d'immunoprécipitation les auteurs ont montré que NuMa se lie à LGN, et crée via la liaison de LGN à  $G_{\alpha i}$ -GDP un complexe NuMA-LGN- $G_{\alpha i}$ . L'étude de l'interaction

entre NuMA et  $G_{\alpha i}$  avec LGN a permis de décrypter le mécanisme d'assemblage de ce complexe. En interphase LGN est dans une conformation 'fermée' par l'interaction intramoléculaire des domaines  $N_{ter}$  et  $C_{ter}$ . En mitose NuMA est libérée du noyau et se lie à LGN, induisant un changement de conformation. LGN peut alors lier  $G_{\alpha i}$ , et ainsi être adressée à la membrane (Du & Macara, 2004).

Ce complexe est intéressant à plus d'un titre. D'une part il montre comment un lien physique entre le fuseau et le cortex peut être créé en mitose (cf figure 1.18 page précédente). D'autre part il suggère un mécanisme par lequel les forces agissant sur le cortex peuvent être régulées via l'adressage cortical de NuMA. En effet NuMA possède un domaine de liaison aux microtubules, et induit *in vitro* la polymérisation des microtubules dans un test de formation de microtubules (Du *et al.*, 2002). La liaison de LGN sur NuMA bloque la capacité de NuMA à induire la polymérisation des microtubules (Du *et al.*, 2002). De plus le site de liaison de LGN sur NuMA recouvre partiellement le domaine de NuMA de liaison aux microtubules. L'interaction de NuMA avec LGN ou les microtubules est donc exclusive. Étant donné la très forte constante d'affinité de LGN pour NuMA, bien supérieure à celle de NuMA pour les microtubules, il apparaît qu'un des rôles de LGN soit de bloquer l'association de NuMA aux microtubules (Du *et al.*, 2002). Cette activité est bien sur régulée, NuMA étant nécessaire aux pôles pour la focalisation des asters au pôle (Merdes *et al.*, 1996).

La situation est différente au cortex où un autre partenaire des protéines G, Ric-8, pourrait jouer un rôle. Une étude biochimique a montré que Ric-8 agit comme **GEF** sur la sous-unité  $G_{\alpha i}$ -GDP au sein du complexe  $G_{\alpha i}$ -GDP-LGN-NuMA. En effet Ric-8 est capable de libérer  $G_{\alpha i}$ -GDP du complexe et de stimuler la liaison au GTP, libérant ainsi une forme  $G_{\alpha i}$ -GTP. Cette dissociation de  $G_{\alpha i}$  conduit en plus à la dissociation de NuMA de LGN (Tall & Gilman, 2005). Cette régulation de NuMA à LGN pourrait permettre d'expliquer la régulation de NuMA au cortex, NuMA ne pouvant lier simultanément LGN et les microtubules. Ainsi sous l'activité de Ric-8 NuMA serait libérée du complexe LGN- $G_{\alpha i}$ -GDP et serait libre d'interagir avec les microtubules et la Dynéine (Tall & Gilman, 2005). La localisation de Ric-8 pourrait être un élément déterminant, cette localisation dictant les endroits où NuMA serait relarguée et libre d'agir avec la Dynéine et les microtubules.

### 1.6.3 Implication des protéines GOA-1, GPA-16 et de leur interacteurs GPR-1/2 et Ric-8 dans la régulation des forces chez *C. elegans*

→ les sous-unités  $G_{\alpha}$  sont impliquées dans l'amplitude des forces asymétriques exercées et la sous-unité  $G_{\beta}$  est impliquée dans la rotation du noyau et contrecarre partiellement l'effet de  $G_{\alpha}$

L'importance et le rôle des protéines G ont été étudiés plus précisément chez *C.elegans*. Ces études ont montré d'une part l'importance des protéines G elles-mêmes mais également des protéines régulatrices de l'état GTP ou GDP telles GPR1/2 et Ric-8.

Les embryons délétés pour  $G_\beta$  révèlent une dérégulation des forces exercées sur le fuseau, avec des vitesses des pôles jusqu'à six fois plus importantes que dans l'embryon sauvage. La division reste asymétrique malgré un défaut d'orientation du noyau selon l'axe A-P. La délétion des  $G_\alpha$  conduit à une division symétrique, liée à une absence de mouvements du noyau de la prophase à la métaphase (Tsou *et al.*, 2003) ainsi qu'une absence de déplacement du fuseau vers le pôle postérieur (Gotta & Ahringer, 2001; Tsou *et al.*, 2003). De plus les mouvements d'oscillations perpendiculaires à l'axe A-P en anaphase sont abolis (Gotta & Ahringer, 2001; Tsou *et al.*, 2003). Ces données montrent que la sous-unité  $G_\beta$  est impliquée dans le contrôle des mouvements du noyau, c'est à dire l'alignement avec l'axe A-P, alors que la sous-unité  $G_\alpha$  est impliquée dans la génération de forces exercées sur le fuseau, dont les oscillations transversales et le déplacement vers le pôle postérieur.

L'observation des doubles délétions des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  a permis de montrer que le phénotype observé dans le mutant  $\beta$  n'était pas dû à un défaut de signalisation de cette sous-unité mais à une signalisation trop importante de la sous unité  $\alpha$ . En effet les embryons délétés pour les deux sous unités montrent un phénotype semblable aux mutants  $G_\alpha$  (Tsou *et al.*, 2003), ce qui implique que les sous-unités  $G_\alpha$  jouent un rôle capital dans l'amplitude des forces exercées sur le fuseau (Tsou *et al.*, 2003).

Les protéines GOA-1 et GPA-16 sont localisées uniformément le long du cortex de l'embryon, ce qui renforce le modèle selon lequel ce ne sont pas les protéines G mais leur activation locale qui importe dans l'asymétrie des forces exercées (Gotta *et al.*, 2003; Srinivasan *et al.*, 2003; Afshar *et al.*, 2005). Dans les embryons délétés pour *goa-1* et *gpa-16* la localisation des protéines PAR-2, PAR-3 et PAR-6 est normale, ce qui suggère que les protéines GOA-1 et GPA-16 agissent en aval des protéines PAR (Gotta *et al.*, 2003).

### → Les protéines GPR-1/2 participent via leur liaison aux sous-unités $G_{\alpha i}$ à la régulation des forces sous le contrôle de la polarité établie par les protéines PAR

Les études de mutants présentant un défaut lors de la division cellulaire ont révélé l'existence de protéines impliquées dans la régulation de l'état GDP ou GTP de la sous-unité  $\alpha$ . Ces protéines sont souvent nécessaires pour la formation d'un complexe contenant  $G_\alpha$ . Ces protéines sont donc impliquées via leur action sur les protéines G dans les processus de division asymétrique. Les gènes *gpr-1* et *gpr-2* ont été identifiés dans une étude portant sur la division cellulaire chez *C.elegans* (Gonczy *et al.*, 2000). Ces gènes étant identiques à plus de 97% au niveau nucléotidique on se référera dans la suite du

texte à *gpr-1/2*. Les protéines GPR-1/2 possèdent comme LGN (mammifères) et Pins (*Drosophila*) un domaine GoLoco.

Les embryons traités par ARN interfèrent contre les gènes *gpr-1* et *gpr-2* présentent des défauts importants de positionnement du fuseau. Dans les embryons *gpr-1/2 (ARNi)* le fuseau ne s'allonge pas asymétriquement vers le pôle postérieur, conduisant à une division symétrique. De même les mouvements transversaux du pôle postérieur sont abolis en anaphase (Colombo *et al.*, 2003). Il y a donc un défaut de régulation des forces exercées sur le fuseau dans les embryons *gpr-1/2 (ARNi)*. En effet les forces exercées sur les pôles du fuseau d'embryons *gpr-1/2 (ARNi)* sont diminuées par rapport à la normale. Ces forces sont équivalentes sur les deux pôles et très nettement inférieures à celle exercées sur les pôles de l'embryon sauvage, même à celles exercées sur le pôle antérieur (Colombo *et al.*, 2003). Ceci suggère que les protéines GPR-1/2 agissent de concert avec la protéine  $G_{\alpha}$  dans la régulation des forces exercées sur le fuseau. Le phénotype des embryons *gpr-1/2, goa-1; gpa-16 (ARNi)* est indiscernable de celui des embryons *gpr-1/2 (RNAi)*, ce qui indique que ces protéines fonctionnent dans une même voie.

L'étude de GPR-1/2 a confirmé la liaison exclusive de GPR-1/2 sur les formes GDP (Colombo *et al.*, 2003; Gotta *et al.*, 2003) de même qu'une action comme **GDI** sur les sous-unités GOA-1 et GPA-16 (Afshar *et al.*, 2004; 2005). Les protéines GPR-1/2 sont enrichies au cortex postérieur de la fin de la prophase jusqu'à l'anaphase (Colombo *et al.*, 2003; Park & Rose, 2007), et cette localisation dépend de l'interaction avec  $G_{\alpha}$ , les protéines GPR-1/2 n'étant plus localisées au cortex dans les embryons traités *G<sub>ai</sub> ARNi*.

L'ensemble de ces données montre que les protéines GPR-1/2 participent à la régulation des forces via leur actions GDI sur les protéines  $G_{\alpha}$ . L'importance des protéines GPR-1/2 souligne en plus la nécessité d'une étape GDP dans le cycle des protéines G, indiquant que ce ne sont pas seulement les protéines à activité **GEF** qui importent dans la régulation de la signalisation des protéines G durant la division.

Les protéines GPR-1/2 agissent en aval des protéines PAR. Les protéines PAR sont correctement localisées dans les embryons *gpr-1/2 (ARNi)*, ce qui indique que le phénotype *gpr-1/2* n'est pas lié à un défaut de polarité de l'embryon mais à un problème de régulation des protéines G. Les protéines GPR ne dépendent pas des protéines PAR pour leur localisation corticale mais leur activité de régulation des forces est dictée par la polarité dépendante des protéines PAR. En effet les protéines GPR sont associées au cortex dans les mutants *par*, mais dans le mutant *par-3* qui présente un cortex 'posteriorisé' la localisation de GPR-1/2 est augmentée et uniforme ainsi que les forces exercées sur le fuseau. A l'inverse la localisation corticale est diminuée (et uniforme) ainsi que les forces dans le mutant *par-2* qui présente un cortex 'antériorisé'.

Autrement dit les protéines GPR peuvent s'associer au cortex via la liaison aux protéines G et leur enrichissement dépend des protéines PAR. Les protéines GPR-1/2 fonctionnent donc en aval des protéines PAR et de concert avec les protéines G dans la

régulation des forces agissant sur le fuseau (Colombo *et al.*, 2003).

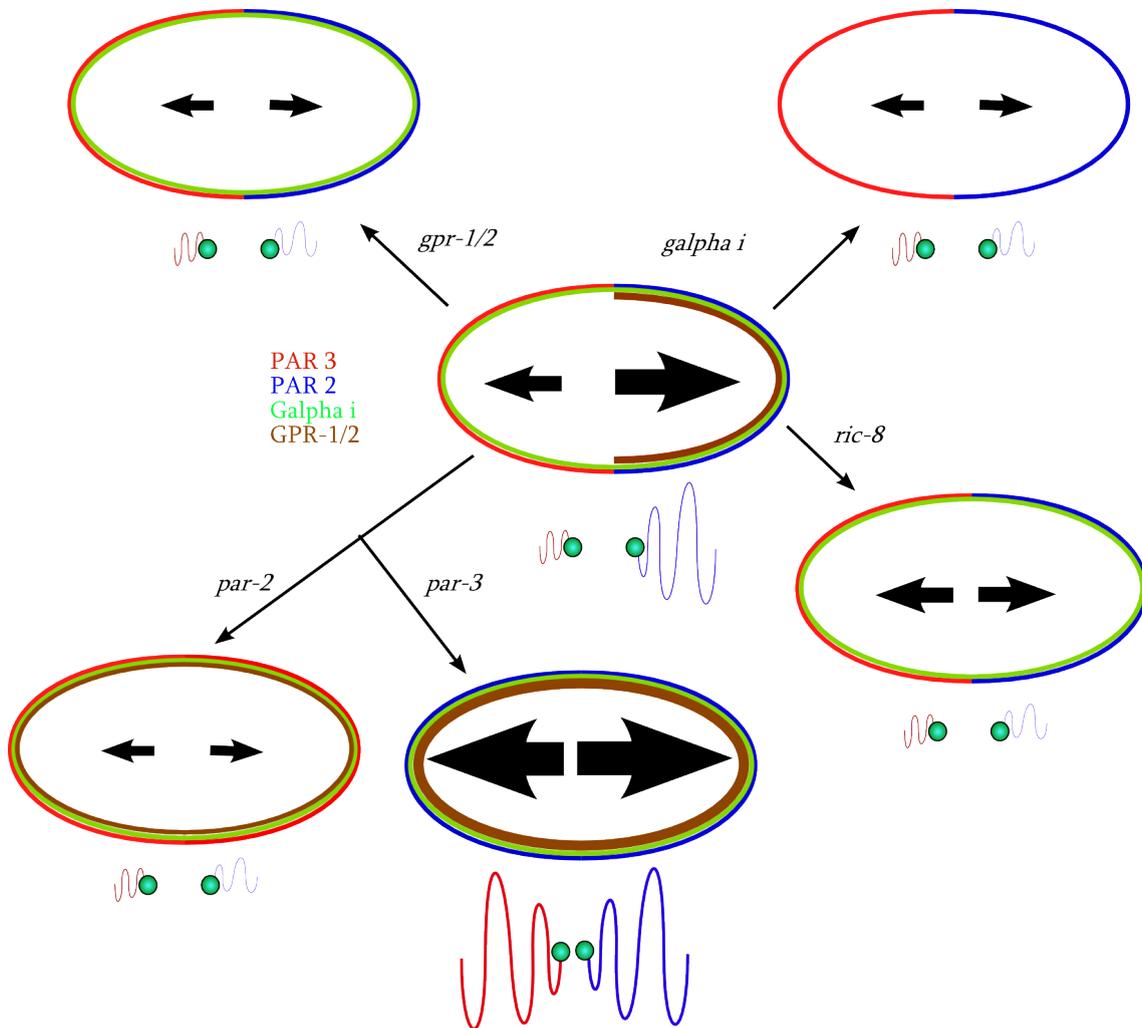


FIGURE 1.19 – Résumé des phénotypes des différents mutants

La situation dans un embryon sauvage est représenté au centre, avec en dessous les mouvements des pôles du fuseau. Dans l'embryon sauvage GPR-1/2 est enrichi au cortex postérieur par la liaison à Ric-8 et GOA-1/GPA-16. Le pôle postérieur est tiré vers le cortex, ce qui déplace le fuseau et induit une division asymétrique. Le pôle postérieur subit des mouvements transverse importants, alors que le pôle antérieur ne subit pratiquement aucun mouvement. Ceci témoigne de l'asymétrie des forces exercées sur le fuseau. Dans le mutant *gpr-1/2* les forces sont fortement diminuées et les mouvements transverse du pôle postérieur sont abolis, ainsi que dans les mutants *par-2*, *goa-1/gpa-16* et *ric-8*. Dans le mutant *par-3* le cortex est postérieurisé, ce qui induit une répartition homogène et augmentée de GPR-1/2. Ceci se traduit par une augmentation des forces exercées sur le fuseau, et des mouvements des pôles.

→ **Ric-8 est nécessaire à la formation du complexe  $G_{\alpha i}$ -GPR-1/2 et participe ainsi à la régulation des forces**

Une protéine particulièrement importante dans la formation des complexes  $G_{\alpha i}$ -GPR-1/2 est Ric-8. La protéine *Resistant to Inhibitors of Cholinesterase* (**RIC**) a été identifié dans l'étude de protéines interagissant avec les protéines  $G_{\alpha i}$  et  $G_{\alpha o}$ . L'étude des propriétés

de Ric-8 sur les protéines G a montré qu'il s'agit d'une **GEF** pour  $G_{\alpha i}$  (Tall *et al.*, 2003). Ric-8 se lie à  $G_{\alpha}$  sous sa forme GDP, permet le largage du GDP et forme un complexe stable avec la forme libre de la  $G_{\alpha}$ . Cette liaison est abolie en présence de GTP (Tall *et al.*, 2003). A l'inverse des récepteurs couplés aux protéines G qui agissent comme **GEF** sur les protéines G trimériques, Ric-8 fonctionne exclusivement sur la sous-unité  $G_{\alpha}$  monomérique, et les sous-unités  $G_{\beta\gamma}$  semblent entrer en compétition pour la liaison sur  $G_{\alpha}$  (Tall *et al.*, 2003).

La protéine Ric-8 a été identifiée comme une protéine clé dans la régulation des protéines G chez *C.elegans* et joue ainsi un rôle dans l'orientation du fuseau. Les embryons *ric-8 ARNi* montrent un défaut de positionnement du fuseau détectable en anaphase. Les premiers évènements sont identiques à la situation dans l'embryon sauvage, mais en anaphase le fuseau ne se déplace que très légèrement vers le pôle postérieur, conduisant à une division quasi symétrique. La mesure de vitesse des pôles dans des embryons *ric-8 ARNi* montre une réduction très importante des forces exercées sur les pôles, comparable à la situation *goa-1 & gpa-16 ARNi*. De plus les mouvements transverses du fuseau sont abolis (Afshar *et al.*, 2004).

L'étude des liaisons entre Ric-8, GPR-1/2 et  $G_{\alpha}$  a montré que Ric-8 est nécessaire à l'association de GPR-1/2 à GOA-1 et GPA-16. A l'inverse l'interaction entre GOA-1 et Ric-8 n'est pas affectée dans les embryons *gpr-1/2 ARNi* (Afshar *et al.*, 2005), mais la localisation enrichie au cortex postérieur de GPR-1/2 est abolie dans les embryons mutants pour *ric-8* (Couwenbergs *et al.*, 2004). Ceci montre que Ric-8 agit en amont de GPR-1/2 dans le cycle de la protéine  $G_{\alpha}$ . La liaison de Ric-8 sur GOA-1 ou GPA-16 permet ainsi la liaison de GPR-1/2, et son adressage cortical. Tout ce système dépend encore une fois de la polarité des protéines PAR, celles-ci étant correctement localisées dans les embryons *ric-8 ARNi* indiquant que Ric-8 agit en aval.

Deux hypothèses sont envisageables pour le fonctionnement des protéines G dans la régulation des forces : soit la  $G_{\alpha}$  joue un rôle dans le positionnement du fuseau dans sa forme liée au GDP, soit l'état lié au GDP est un état intermédiaire nécessaire pour l'échange GDP avec du GTP et le passage à un état activé. Il semble que la régulation des sous-unités GOA-1 et GPA-16 soit différente et permette d'envisager les deux possibilités (cf figures 1.20 et 1.21 page suivante).

### Les protéine G : élément central dans la régulation des forces

Le modèle qui émerge de ces données montre que les protéines G sont au cœur du processus de génération de force, plus exactement de la régulation des forces exercées sur le fuseau. La protéine Ric-8 semble être le premier maillon dans le cycle des sous-unités  $\alpha$ . La stabilisation de l'état libre de la sous-unité  $\alpha$  permet la dissociation des sous-unités  $\beta\gamma$ , et ainsi la possibilité de lier le GTP sans avoir recours à une activation par un récepteur. Il est encore difficile de savoir si c'est dans sa forme GDP ou GTP que la sous-unité  $\alpha$

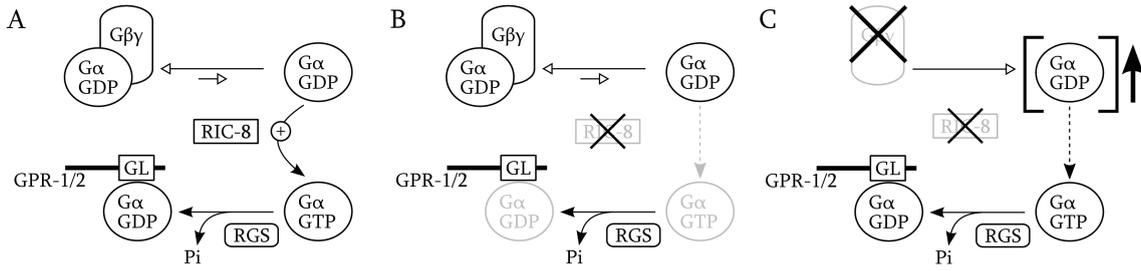


FIGURE 1.20 – Cycle de la protéine GOA-1

A : Ric-8 permet la libération de la sous-unité  $\alpha$  du complexe  $G\alpha/G\beta\gamma$ . La sous-unité libérée échange le GDP pour du GTP, et sous l'action d'une protéine à activité RGS hydrolyse celui-ci. La sous-unité  $\alpha$  interagit alors avec les protéines GRP-1/2. B : en l'absence de Ric-8 la sous-unité  $\alpha$  n'est pas libérée et ne peut interagir avec GPR-1/2. C : si Ric-8 et les sous-unités  $\beta\gamma$  sont absentes, la sous-unité  $\alpha$  peut échanger son GDP, libérée de l'activité GDI des sous-unités  $\beta\gamma$ , et ainsi interagir avec GRP-1/2. D'après (Afshar *et al.*, 2004)

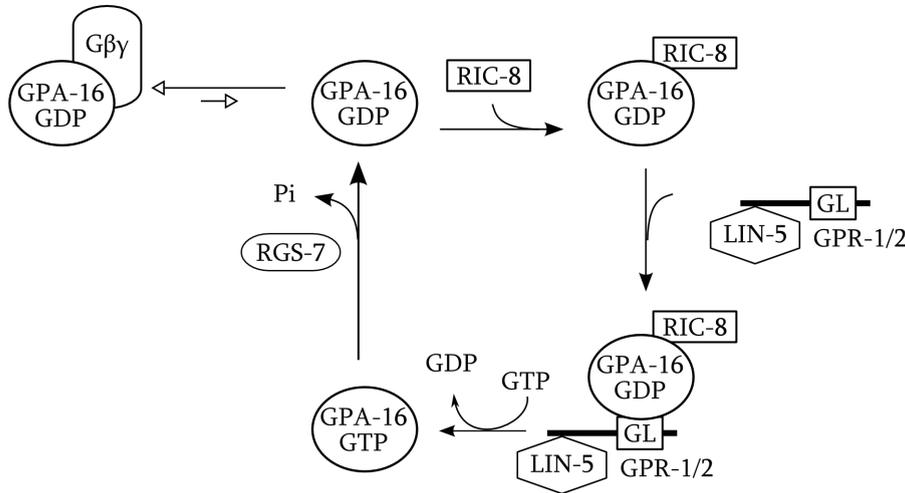


FIGURE 1.21 – Cycle de la protéine GPA-16

Ric-8 permet la formation d'un complexe Ric-8/GPA-GDP libéré des sous-unités  $\beta\gamma$ . Ceci permet l'association de GPR-1/2 et LIN-5. GPA-16 échange alors le GDP pour du GTP, et sous l'action de RGS-7, hydrolyse le GTP en GDP et retourne à sa configuration initiale, libre d'interagir avec les sous-unités  $\beta\gamma$  ou Ric-8. D'après (Afshar *et al.*, 2005)

joue son rôle de régulateur des générateurs de force, de même qu'il est difficile de savoir si la sous-unité  $\alpha$  joue un rôle direct dans la régulation des générateurs de force ou permet la formation de complexe transitoire au cortex entre générateurs de force d'une part et protéine activatrice et/ou régulatrice d'autre part. Il semble qu'un chaînon soit encore à découvrir dans ces mécanismes.

### 1.6.4 Rôle de Pins et Ric-8 dans la régulation des protéines G et dans le contrôle de l'orientation et de l'alignement chez la drosophile

L'étude du rôle des protéines G chez *C. elegans* a montré combien ces protéines jouent un rôle essentiel dans la régulation des forces exercées sur le fuseau. Les études chez la drosophile ont montré combien ces protéines et les complexes au sein desquelles elles se trouvent sont importantes dans les mécanismes d'orientation avec un axe de polarité.

#### Neuroblaste

→ **La protéine Pins permet l'assemblage de complexes moléculaires localisés asymétriquement au cortex et participe ainsi à l'orientation du fuseau**

La protéine homologue de LGN est **Pins**, pour *Partner of Inscuteable*. Cette protéine contient sept domaines tetratricopeptide (**TPR**) et trois domaines **GoLoco**. Pins peut lier Mud, l'homologue de NuMA, par ses domaines TPR et  $G_{\alpha i}$ -GDP par ses domaines GoLoco, chaque domaine pouvant lier une protéine  $G_{\alpha i}$ -GDP (Willard *et al.*, 2004). L'étude de l'orientation du fuseau dans les mutants *pins* a montré l'implication de Pins dans l'orientation correcte du fuseau avec l'axe apico-basal. Dans la plupart des mutants *pins* le fuseau n'est pas aligné suivant l'axe apico-basal. La délétion de Pins entraîne en plus une localisation aberrante de Miranda (un facteur de déterminant cellulaire), qui n'est soit plus corticale soit enrichie en un croissant non basal (Schaefer *et al.*, 2000).

PINS, à l'inverse de Inscuteable, est exprimée dans les cellules épithéliales avant la délamination, et est localisée au cortex sans signe de localisation asymétrique (Schaefer *et al.*, 2000). Durant la délamination Pins est enrichie au cortex apical, et colocalise avec Inscuteable. Les deux protéines restent colocalisées jusqu'à l'anaphase où le marquage cortical diminue. Deux voies partiellement redondantes dictent la localisation de Pins : la voie dépendante de Inscuteable, et la voie dépendante du complexe Khc-73/Dlg et des microtubules (Siegrist & Doe, 2005). Dans les embryons sauvages l'enrichissement de Pins/ $G_{\alpha i}$  est détectable dès la prophase. Dans les mutants *insc*, cet enrichissement n'est jamais observé en prophase, pourtant un enrichissement localisé aléatoirement est détectable en métaphase. Cet enrichissement suppose donc une voie indépendante de Inscuteable. Une observation intéressante est la présence à proximité de cet enrichissement d'un pôle du fuseau, ce qui suggère un mécanisme dépendant des microtubules astériens. L'utilisation de colcemide ou de nocodazole à faible dose pour inhiber spécifiquement les microtubules astériens a en effet montré que l'enrichissement corticale repose sur les microtubules astériens, l'absence de ceux-ci se traduisant par une absence d'enrichissement de Pins/ $G_{\alpha i}$ . Cette voie repose en plus sur Dlg et Kinesine heavy chain 73, Khc-73, une kinésine. En l'absence d'une de ces deux protéines l'enrichissement cortical de Pins n'est pas observé ce qui provoque un problème de ségrégation des déterminants cellulaires.

L'étude de Dlg et Khc-73 suggère un modèle dans le lequel Khc-73, localisée aux bouts  $\oplus$  des microtubules astériens, contacte le cortex et induit l'accumulation de Dlg<sup>1</sup>. Cette accumulation à son tour provoque l'enrichissement de Pins/ $G_{\alpha i}$  (Siegrist & Doe, 2005) (cf figure 1.22).

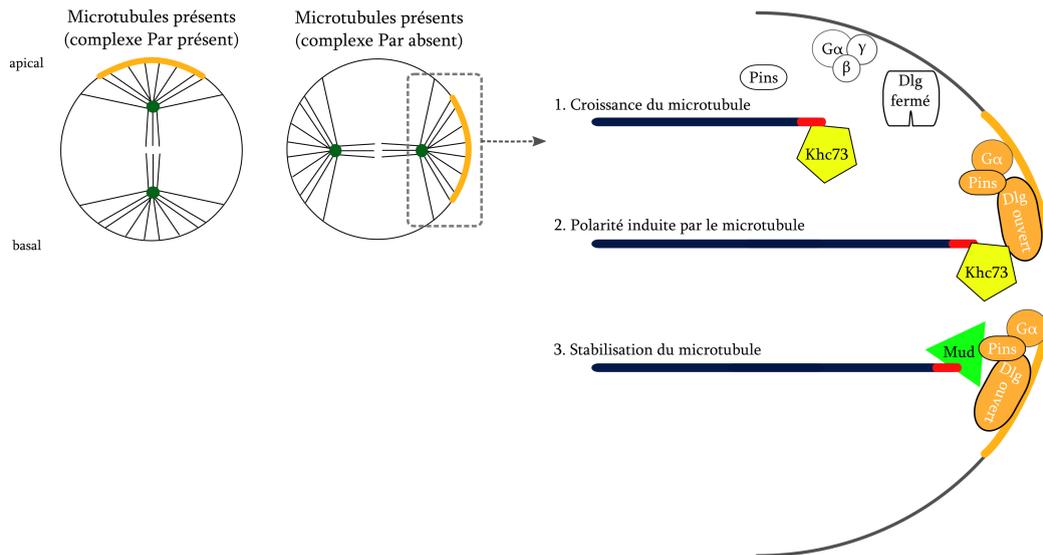


FIGURE 1.22 – Polarisation du cortex sous l'action des microtubules

Sous le contrôle de la polarité établie par les protéines PAR, les microtubules du centrosome apical vont permettre l'orientation du fuseau avec cet axe de polarité (gauche). En l'absence des protéines PAR et d'une polarité établie, les microtubules sont néanmoins capable d'induire l'enrichissement cortical de Pins. Khc-73, localisé aux bouts  $\oplus$  des microtubules, interagit avec Dlg, localisée au cortex. L'interaction de Khc-73 avec Dlg permet le recrutement de Pins/ $G_{\alpha i}$  et leurs enrichissements. Cet enrichissement permet d'établir un lien avec Mud et ainsi d'orienter le fuseau. D'après (Siegrist & Doe, 2005; 2007)

Au delà de son rôle dans l'enrichissement cortical de Pins/ $G_{\alpha i}$ , cette voie est nécessaire à l'alignement correct du fuseau avec la polarité. En effet une partie des fuseaux n'est pas correctement alignée avec l'axe de polarité qui est non perturbé dans les mutants *dlg* ou *khc-73*. Ce mécanisme montre donc une voie redondante au mécanisme général dépendant de Inscuteable, qui peut en partie se substituer à celui-ci en l'absence de Insc, et qui est de plus requis pour l'orientation correcte des fuseaux. Pour une revue générale sur la polarité induite par les microtubules consulter (Siegrist & Doe, 2007).

→ **La protéine Ric-8 participe également à la formation de complexes moléculaires et joue donc un rôle dans la localisation asymétrique de ces complexes**

L'étude de la liaison de Ric-8 à  $G_{\alpha i}$  a montré que Ric-8 se fixe préférentiellement à  $G_{\alpha i}$  dans sa forme GDP (Wang *et al.*, 2005). Les neuroblastes d'embryons mutants pour *ric-8* présentent un défaut d'orientation du fuseau selon l'axe apico-basal (Hampoelz *et al.*,

1. Dlg interagit avec APC dans les cellules de mammifères, et cette interaction est nécessaire à la réorientation du centrosome dans les astrocytes en migration, cf partie 'APC et la polarité' p.49

2005). Ric-8 joue comme chez *C. elegans* un rôle dans la formation du complexe Pins- $G_{\alpha i}$  (Wang *et al.*, 2005), ces deux protéines ne coimmunoprécipitent pas dans les embryons mutants *ric-8* (Hampoelz *et al.*, 2005). De plus Pins et  $G_{\alpha i}$  ne sont plus localisées apicalement dans les neuroblastes de mutants *ric-8* (Wang *et al.*, 2005). L'étude de la liaison de Ric-8 à  $G_{\alpha i}$  et Pins a cependant montré des caractéristiques sensiblement différentes de chez *C. elegans*. En effet Ric-8 en excès peut dissocier le complexe Pins- $G_{\alpha i}$ , alors que Pins ne peut dissocier le complexe Ric-8- $G_{\alpha i}$ . Ceci concorde en un sens avec les données du groupe de F. Yu qui montre la capacité de Ric-8 à s'associer directement avec Pins (Wang *et al.*, 2005). Ric-8 joue donc un rôle direct dans la formation d'un complexe contenant  $G_{\alpha i}$  et Pins, et via son rôle régulateur sur  $G_{\alpha i}$  permet la localisation correcte des protéines des domaines apicaux et basaux. Ces données montrent une fois de plus le rôle central joué par les protéines G et leurs régulateurs, ici Ric-8. La perturbation de la régulation de la voie  $G_{\alpha i}$  débouche sur des problèmes d'établissement de domaines corticaux définissant la polarité et ainsi d'orientation du fuseau.

### Sensory Organ Precursor

→ **Pins ne participe pas à l'orientation mais à l'alignement planaire**

La protéine  $G_{\alpha i}$  est localisée au cortex antérieur du SOP, et ce dès l'interphase (Schaefer *et al.*, 2001).  $G_{\alpha i}$  n'est pas indispensable pour l'orientation correcte du fuseau (David *et al.*, 2005). De façon intéressante  $G_{\alpha i}$  se localise asymétriquement ainsi que Numb en mitose dans les mutants *frizzled*, mais le croissant asymétrique n'est pas correctement localisé, indiquant que le **PCP** fonctionne dans la localisation du croissant mais pas dans l'enrichissement asymétrique (Schaefer *et al.*, 2001). De plus  $G_{\alpha i}$  est impliquée dans l'enrichissement cortical en un croissant de Pins et de Bazooka, l'homologue de Par3. En effet en l'absence de  $G_{\alpha i}$  Pins et Baz sont associées au cortex mais réparties uniformément le long de la membrane (David *et al.*, 2005). Ceci suggère un rôle de  $G_{\alpha i}$  non pas dans l'adressage au cortex mais dans l'enrichissement cortical de ces protéines.

Pins est localisée au cortex antérieur du SOP en métaphase, et colocalise avec  $G_{\alpha i}$ . Pins n'est pas indispensable à l'orientation du fuseau selon l'axe antéro-postérieur, les embryons *pins ARNi* montrant les mêmes orientations du fuseau que les embryons sauvages (David *et al.*, 2005). Mais Pins est requis pour l'alignement du fuseau dans le plan de l'épithélium. Les mutants *pins ARNi* présentent en effet une augmentation importante de l'angle entre le fuseau et le plan de l'épithélium (David *et al.*, 2005). Pins joue donc ici un rôle dans l'alignement planaire du fuseau (cf figures 1.15 page 21, 1.11 page 14 et 1.23 page suivante).

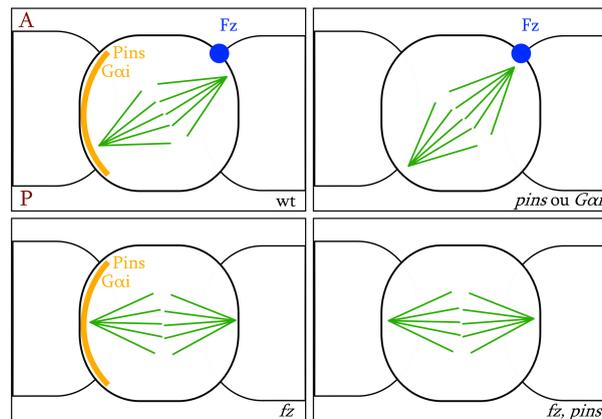


FIGURE 1.23 – Alignement du fuseau dans le SOP sous contrôle de Frizzled,  $G_{\alpha i}$  et Pins

Vue latérale de l'alignement du fuseau dans le SOP. L'action de Frizzled et Pins/ $G_{\alpha i}$  s'antagonise pour conduire à l'alignement du fuseau avec un angle faible par rapport au plan de l'épithélium. En l'absence de Pins/ $G_{\alpha i}$ , Frizzled localisé antérieurement au pôle apical impose un angle important au fuseau. A l'inverse en l'absence de Frizzled, Pins/ $G_{\alpha i}$  localisé latéralement au cortex postérieur aligne le fuseau parallèlement au plan de l'épithélium. Enfin en l'absence de Pins/ $G_{\alpha i}$  et Frizzled, le fuseau s'aligne planairement. D'après (David *et al.*, 2005)

→ **La protéine Ric-8 participe comme dans le neuroblaste à la formation de complexe moléculaires et joue donc un rôle dans la localisation asymétrique de ces complexes**

Les SOP *ric-8 ARNi* présentent une conversion de cellules pIIa en pIIb, défaut souvent lié à un problème de ségrégation de déterminants cellulaires lors de la division de pI. L'étude de la localisation de  $G_{\alpha i}$ , Pins, Bazooka et Numb a confirmé cette hypothèse (David *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). Numb n'est plus enrichie au cortex antérieur dans les cellules pI d'embryons *ric-8 ARNi*, cependant un mécanisme de sauvetage en anaphase permet une localisation enrichie mais faible de Pon et Numb au cortex antérieur (David *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). Bazooka (normalement enrichie au cortex antérieur) se retrouve localisée uniformément au cortex alors Pins et  $G_{\alpha i}$  ne sont plus enrichies au cortex antérieur dans les cellules pI d'embryons *ric-8 ARNi* (David *et al.*, 2005). Les cellules pI d'embryons *ric-8 ARNi* présentent donc un défaut général de polarité.

Les cellules pI d'embryons *ric-8 ARNi* présentent en plus le même défaut d'alignement planaire du fuseau que les embryons *pins ARNi*, à savoir un fuseau formant un angle plus important avec le plan de l'épithélium. A l'inverse l'axe des centrosomes est parfaitement parallèle à l'axe de l'épithélium dans les mutants *frizzled*. Ces données suggèrent un modèle où l'activité corticale de Frizzled et Pins/ $G_{\alpha i}$  s'antagonise pour aligner les pôles du fuseau dans un plan formant un angle faible avec l'épithélium. Frizzled localisé au pôle apical en l'absence de Pins/ $G_{\alpha i}$  imprime un angle important au fuseau, alors Pins/ $G_{\alpha i}$  localisées le long du cortex antérieur selon l'axe apico-basal orientent le fuseau parallèlement (David *et al.*, 2005) (cf figure 1.23).

### 1.6.5 Mud agit sous le contrôle de Pins dans l'orientation du fuseau dans le neuroblaste

→ **Mud connecte le fuseau par sa liaison aux microtubules au cortex par sa liaison à Pins qui dicte sa localisation**

L'homologue fonctionnel de NuMA chez la Drosophile est la protéine **Mud**, cette homologie étant relativement faible et basée sur des conservations de domaines (Bowman *et al.*, 2006).

Les mesures d'orientation des fuseaux en rapport avec l'axe de polarité révèlent que la majorité des fuseaux dans le neuroblaste sont mal orientés dans les embryons mutants pour *mud* (Siller *et al.*, 2006), le fuseau étant correctement assemblé (Bowman *et al.*, 2006). Ce phénotype est aussi observable dans les cellules épithéliales, l'alignement du fuseau parallèlement au plan de l'épithélium étant altéré dans les mutants *mud* (Izumi *et al.*, 2006). Ce défaut n'est pas dû à un problème de polarité du neuroblaste, les domaines apicaux et basaux étant correctement définis (Bowman *et al.*, 2006). Mud n'est donc pas impliquée dans la délimitation des territoires corticaux.

L'expression ectopique de Inscuteable dans les cellules épithéliales entraîne la relocalisation de Pins et de Mud au cortex apical. De plus les fuseaux s'orientent avec le croissant de Pins-Mud en mitose. Mud peut en effet se lier à Pins directement (Izumi *et al.*, 2006), et former ainsi un complexe Pins- $G_{\alpha i}$  (Bowman *et al.*, 2006). Dans les mutants *pins* ni Mud ni Inscuteable ectopique ne sont localisées au cortex apical, et le fuseau ne change pas d'orientation. Ainsi Pins est capable d'induire la localisation de Mud, et ce complexe dirige l'orientation du fuseau. Mud agit donc en aval du complexe Pins- $G_{\alpha}$  pour dicter l'orientation du fuseau en relation avec la polarité corticale (Izumi *et al.*, 2006).

De façon similaire à NuMA chez les mammifères, Mud peut se lier aux microtubules, et induire la polymérisation des microtubules (Bowman *et al.*, 2006).

Récemment le fonctionnement de Mud au sein du complexe Mud/ $G_{\alpha i}$ /Pins a été décrit plus précisément dans le neuroblaste. Les trois domaines GoLoco de Pins ne sont pas équivalents. Ainsi le domaine GoLoco1 n'a pas d'influence sur la formation du complexe  $G_{\alpha i}$ /Pins/Mud, à l'inverse des domaines GoLoco2 et GoLoco3 qui augmentent fortement la liaison de Mud à Pins suite à la liaison de  $G_{\alpha i}$ . La liaison de  $G_{\alpha i}$  sur le domaine GoLoco1 crée un état transitoire partiellement déplié, qui permet par la liaison additionnelle de  $G_{\alpha i}$  sur les motifs GoLoco2 et GoLoco3 d'adopter un état déplié et de recruter Mud. Dans des neuroblastes dont l'expression de  $G_{\alpha i}$  est diminuée, l'enrichissement en croissant de Pins et Insc est correct mais pas celui de Mud. Dans ces neuroblastes le fuseau n'est pas orienté avec cet enrichissement cortical, provoquant un problème d'orientation. Ces données suggèrent un modèle de régulation de l'adressage de Mud au cortex en fonction de l'état de polarité du cortex. Au début de l'accumulation de  $G_{\alpha i}$  au cortex Pins est adressée via son domaine GoLoco1. Lorsque  $G_{\alpha i}$  se trouve plus enrichie, la liaison sur les domaines GoLoco2 et GoLoco3 permet la liaison de Mud, et dirige l'orientation du

fuseau. Ce mécanisme de liaison coopérative empêche l'adressage de Mud au cortex avant la polarisation correcte du complexe contenant Pins et dirigée par  $G_{\alpha i}$  (Nipper *et al.*, 2007).

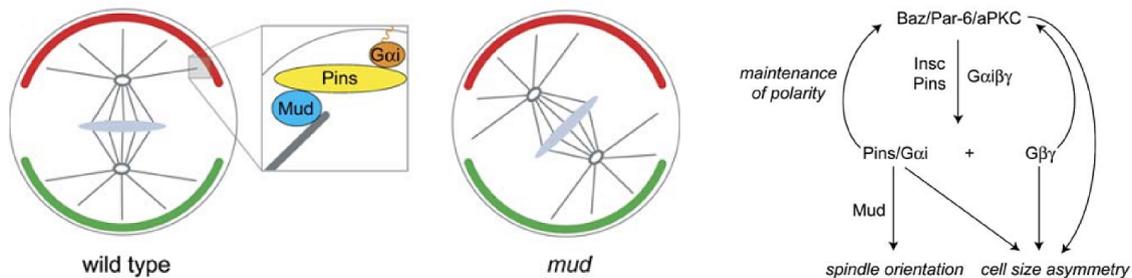


FIGURE 1.24 – Connexion de Mud au cortex via Pins et  $G_{\alpha i}$

Pins interagit avec  $G_{\alpha i}$  localisée au cortex. Suite à la liaison de plusieurs  $G_{\alpha i}$  Pins peut interagir avec Mud. Ceci permet d'orienter le fuseau par rapport à la polarité corticale. En l'absence de Mud le fuseau ne peut s'orienter par rapport à cette polarité corticale. D'après (Bowman *et al.*, 2006)

### 1.6.6 Rôle de Lin-5 et de la Dynéine chez *C. elegans*

→ LIN-5 s'associe à GPR-1/2 et à la Dynéine permettant d'établir un lien entre le fuseau et le cortex

L'homologue de NuMA chez *C. elegans* est LIN-5. LIN-5 est impliquée dans l'alignement des chromosomes en métaphase et la séparation des chromatides soeurs (Lorson *et al.*, 2000). La protéine LIN-5 est localisée aux centrosomes, le long des microtubules kinétochoriens, et au cortex à partir du stade deux cellules (Lorson *et al.*, 2000; Srinivasan *et al.*, 2003). Une analyse quantitative d'intensité de fluorescence a cependant révélé que LIN-5 est localisée au cortex et enrichie à partir de la métaphase au stade une cellule (Park & Rose, 2007).

Les embryons *lin-5 ARNi* présentent une abolition du déplacement du pôle postérieur vers le cortex postérieur de l'embryon, de même que les mouvements transverses sont annulés. A l'inverse le pôle antérieur est tiré vers le cortex antérieur de l'embryon, ce qui conduit à une division donnant un blastomère AB plus petit que le blastomère P1 (Srinivasan *et al.*, 2003). Ce phénotype n'est pas abrogé dans les embryons *lin-5 & gpr-1/2 ARNi* ce qui suggère que la fonction de LIN-5 est d'antagoniser ce déplacement vers le pôle antérieur, indépendamment de GPR-1/2 (Srinivasan *et al.*, 2003).

LIN-5 existe au sein d'un complexe contenant GOA-1, GPA-16 (Colombo *et al.*, 2003; Gotta *et al.*, 2003; Srinivasan *et al.*, 2003) et GRP-1/2 (Park & Rose, 2007). GPR-1/2 est requise pour la formation du complexe et l'enrichissement au cortex postérieur (Park & Rose, 2007). La protéine GPR-1/2 n'est plus adressée au cortex dans les embryons *lin-5 ARNi* (Gotta *et al.*, 2003; Srinivasan *et al.*, 2003; Park & Rose, 2007), ce qui suggère que LIN-5 est également impliquée dans la formation du complexe contenant GPR-1/2 et

permet ainsi l'adressage cortical de ce complexe pour la régulation des forces en réponse à une polarité.

Il a été montré que LIN-5 interagit avec une chaîne légère de la dynéine, DYRB-1 (Couwenbergs *et al.*, 2007), et LIS-1, une protéine interagissant avec la Dynéine (Nguyen-Ngoc *et al.*, 2007). Ces données permettent d'envisager un modèle où une localisation asymétrique d'un complexe  $G_{\alpha i}$ /GPR-1/2/LIN-5 lié à l'activation de la Dynéine via LIN-5 et Lis1 expliquerait la régulation des forces agissant sur le fuseau (cf figure 1.25). Ce modèle est discuté dans la partie suivante qui traite de la Dynéine comme générateur de force.

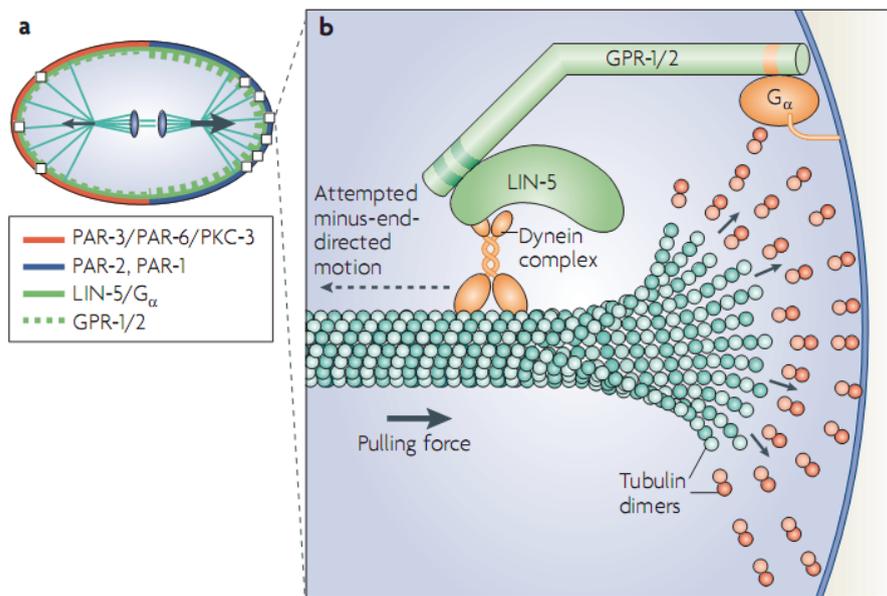


FIGURE 1.25 – Formation du complexe Lin5-GPR-1/2- $G_{\alpha i}$  en mitose et lien avec la Dynéine

GPR-1/2 adopte une conformation ouverte suite à la liaison de LIN-5. Ceci permet la liaison à  $G_{\alpha}$  ancrée au cortex, et ainsi d'adresser le complexe LIN-5/GPR-1/2 au cortex. LIN-5 pouvant interagir avec la Dynéine, le complexe LIN-5/GPR-1/2/ $G_{\alpha}$  pourrait par sa liaison à la Dynéine tirer sur un pôle du fuseau via l'activité motrice de la Dynéine, couplée à la dépolymérisation du microtubule. D'après (Gonczy, 2008)

### 1.6.7 Générateurs de force

L'étude du comportement du fuseau mitotique dans différents modèles cellulaires a montré que cette structure subit des forces. Ces forces sont exercées par des complexes moteurs localisés à la membrane et agissant via les microtubules astériens. Cette partie détaille les rôles connus de la Dynéine comme générateur de force dans le modèle de la levure bourgeonnante, et son rôle probable chez *C.elegans* et les mammifères.

## Le complexe Dynéine/Dynactine et la génération de forces

La Dynéine est un moteur moléculaire, composé de deux chaînes lourdes et de plusieurs chaînes légères. Ce moteur est dirigé vers le bout  $\ominus$  des microtubules, et est impliqué dans un grand nombre de processus parmi lesquels le transport d'éléments de l'appareil de Golgi, de lysosomes, d'endosome tardifs et de recyclage, du transport axonal retrograde. La Dynéine participe également dans la réorientation du centrosome au cours de la migration (Dujardin *et al.*, 2003). En mitose la Dynéine s'associe aux kinétochores, où elle participe à la capture des microtubules et à l'évacuation des protéines du check-point. La Dynéine participe en plus à l'assemblage du fuseau. La Dynactine, partenaire de la Dynéine, est impliquée dans l'activation de la Dynéine. On fait ainsi référence à la Dynactine en tant que co-facteur de la Dynéine. La dynactine est également constituée de sous-unités, parmi lesquelles p150<sup>Glued</sup>, p50 ou dynamitine et Arp1 (Schroer, 2004).

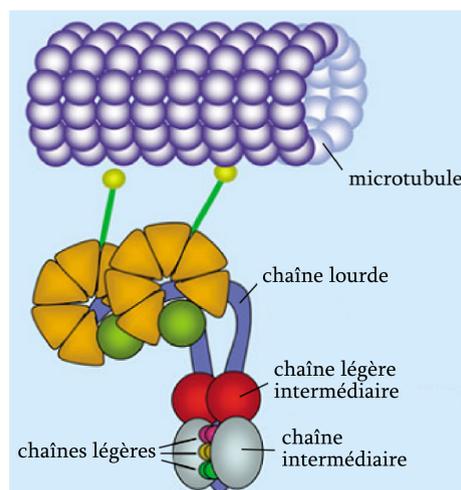


FIGURE 1.26 – Domaines de la Dynéine  
(Höök & Vallee, 2006)

Il existe deux classes de Dynéine : la Dynéine axonemale et la Dynéine cytosolique. La Dynéine est une protéine composée de plusieurs sous-unités, dont une à trois chaînes lourdes qui contiennent le domaine moteur. Celui-ci contient six unités ATPasiques de type AAA. L'énergie de l'hydrolyse de l'ATP est transmise à la base de la molécule et au domaine de liaison aux microtubules pour la génération de force. Associées à cette chaîne lourde se trouvent des sous unités intermédiaires, intermédiaires légères et chaînes légères (Höök & Vallee, 2006). L'ensemble de ces chaînes est représenté sur la figure 1.26.

**Rôle de la Dynéine dans le positionnement du fuseau** Le rôle de la Dynéine en mitose a été montré chez la levure bourgeonnante *S.Cerevisiae*, chez laquelle le mécanisme d'orientation du fuseau se fait en deux étapes :

- une première étape dépendante de Bim1p et Kar9p qui consiste à orienter le fuseau avec le lieu de bourgeonnement

- une deuxième étape dépendante de la Dynéine qui consiste à tirer le fuseau à travers le col du bourgeon de façon à positionner les chromosomes en relation avec le site pré-défini de clivage. (cf figure 1.27 page suivante)

Pendant la phase G1 les microtubules qui émanent du *Spindle Pole Body* (SPB, l'équivalent chez la levure du MTOC) sondent le cortex. Les microtubules vont être stabilisés au site du futur bourgeon, et pouvoir ainsi orienter le SPB avec ce site cortical. Le SPB est dupliqué, et le vieux SPB se positionne en rapport avec le site de bourgeonnement. Les microtubules astériens vont contacter le cortex dans le bourgeon à travers le col, et continuer à orienter le fuseau en rapport avec le bourgeon. Ce processus repose majoritairement sur Kar9p, qui est transporté le long des microtubules par Bim1p et la kinésine Kip2p. Récemment la Dynactine a été impliquée dans ce mécanisme d'orientation du fuseau (Moore *et al.*, 2008). Ce mécanisme repose également sur le cytosquelette d'actine, la myosine Myo2p étant impliquée dans le transport du complexe Bim1p-Kar9p le long des câbles d'actine.

La deuxième étape consiste à l'insertion du fuseau mitotique à travers le col du bourgeon, celui-ci représentant la séparation entre les deux cellules filles. Le fuseau est tiré à travers ce col par la Dynéine, associée au cortex du bourgeon à Num1p. La Dynéine est apportée aux bouts  $\oplus$  des microtubules par Bik1p et Pac1p, les homologues chez la levure de CLIP-170 et Lis1 respectivement. La Dynéine ancrée au cortex génère une force de traction sur le microtubule en faisant glisser celui-ci le long de la membrane. Il ne s'agit donc pas ici d'un mécanisme de traction lié à une dépolymérisation du microtubule.

Le nombre important de fonctions de la Dynéine a limité fortement l'étude de ses fonctions en mitose chez les mammifères, l'inhibition de la Dynéine par siRNA, injection d'anticorps bloquant ou surexpression de la p50 dynamitin entraînant un désassemblage du fuseau. Le complexe Dynéine/Dynactine est localisé au cortex dans les cellules MDCK polarisées en mitose (Busson *et al.*, 1998). Néanmoins le rôle précis de la Dynéine au cortex n'a toujours pas pu être montré dans des cellules de mammifère.

Néanmoins l'étude de la Dynéine est possible dans *C. elegans*, où plusieurs études récentes ont révélé son importance en mitose (Couwenbergs *et al.*, 2007; Nguyen-Ngoc *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008). La Dynéine est le candidat principal comme générateur de forces. Ces forces déplacent le fuseau postérieurement et impriment des mouvements d'oscillation transverses du pôle postérieur en anaphase. L'apparition de ces forces nécessite un nombre suffisant de générateurs de force (Pecreaux *et al.*, 2006).

Chez *C. elegans* l'utilisation de mutants ou siRNA ciblant la Dynéine interfère avec la formation du fuseau. L'utilisation de mutants thermosensibles, de délétion partielle ou de double mutants permet de surmonter ce problème. Après inhibition des fonctions de la Dynéine, une diminution des forces agissant sur le fuseau est mesurée (Nguyen-Ngoc *et al.*, 2007), de même qu'une perte de l'asymétrie des forces (Couwenbergs *et al.*,

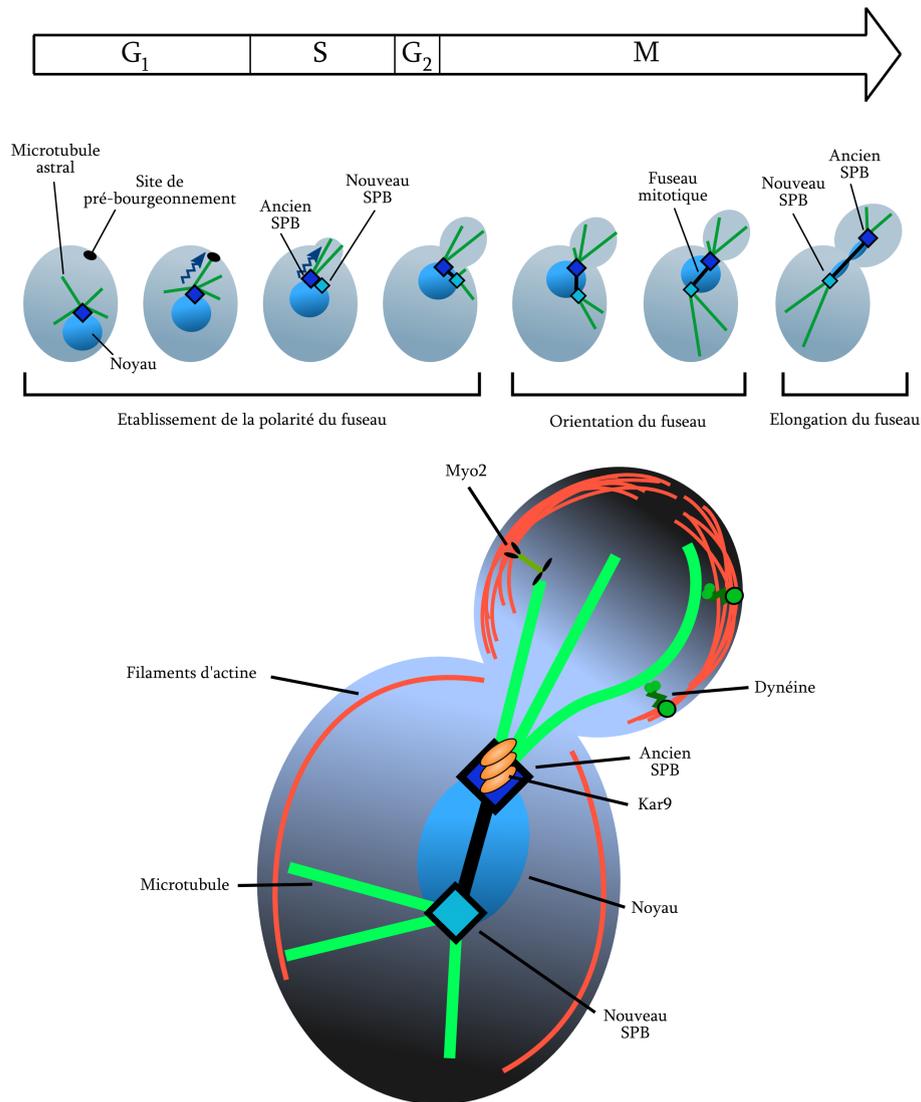


FIGURE 1.27 – Implication de la Dynéine chez la levure bourgeonnante

Pendant la phase G1 les microtubules qui polymérisent à partir du SPB père sondent le cortex. Les microtubules qui contactent l'endroit d'où émergera le bourgeon sont stabilisés, et orientent le SPB vers ce site. Le SPB nouvellement formé est progressivement amené à l'opposé pour former un fuseau. Les microtubules du SPB père sondent le cortex du bourgeon en formation, via Kar9p localisé aux bouts  $\oplus$  Microtubule/bout  $\oplus$  des microtubules par Bim1p et Kip2p. Ce complexe se déplace le long des câbles d'actine grâce à l'action de la myosine Myo2p. Une fois le fuseau orienté avec le bourgeon, la Dynéine tire sur les microtubules et permet ainsi au fuseau d'être amené au col du bourgeon. Ce mécanisme assure la ségrégation correcte du matériel chromosomique dans les deux cellules filles. D'après (Pearson & Bloom, 2004; Huisman & Segal, 2005)

2007). Cette diminution des forces exercées sur le fuseau n'est pas due à un problème de polarité de l'embryon, les protéines PAR, GPR-1/2 et LIN-5 étant correctement localisées (Couwenbergs *et al.*, 2007). La Dynéine se localise au cortex en mitose, cette localisation étant faible dans la première division et plus apparente aux stades 2 et 4 cellules. La localisation corticale de la Dynéine dépend de son interaction avec LIN-5 et GPR-1/2

(Nguyen-Ngoc *et al.*, 2007). Ainsi l'association de la Dynéine à LIN-5 et GPR-1/2 permet sa localisation corticale, où elle participe à la génération de forces agissant sur le fuseau. La fonction de la Dynactine a été étudiée dans les divisions des cellules P2 et EMS. La Dynactine se localise au cortex entre les cellules P2 et EMS, de même qu'au cortex des cellules issues de leur division. Cette localisation est sous le contrôle des voies Wnt et Src. De plus cette accumulation corticale de la Dynactine participe à la régulation de l'orientation du fuseau mitotique lors de la rotation des fuseaux dans la cellule P2 et EMS (Zhang *et al.*, 2008). Le rôle de la Dynactine a également été montré dans le neuroblaste chez la Drosophile. En effet la Dynactine est impliquée dans le mécanisme d'orientation du fuseau, en collaboration avec Lis1 (Siller & Doe, 2008). Les embryons mutants pour *lis1* ou *dynactine* présentent un défaut d'orientation du fuseau avec l'axe de polarité. De plus les fuseaux sont moins dynamiques dans ces mutants, ce qui corrobore un rôle de la Dynéine/Dynactine dans la génération de force et la transmission au fuseau. La Dynéine pourrait exercer des forces de traction sur les pôles en étant stabilisée par sa liaison à LIN-5 et  $G_{\alpha i}$  membranaire. La régulation de la dynamique des microtubules couplée à une force de traction par la Dynéine permettrait de tirer sur un pôle et de déplacer le fuseau.

## 1.7 La protéine APC en mitose et dans la polarité

Le gène *Apc* a été identifié initialement dans le cadre des recherches sur le cancer du côlon. L'étude d'APC dans le cadre de la signalisation Wnt a montré son rôle prépondérant dans l'assemblage du complexe Axine-GSK3 $\beta$ - $\beta$ -caténine en l'absence de ligand Wnt. Ceci permet la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine et son adressage au protéasome conduisant à sa dégradation. Cependant l'étude du rôle d'APC dans un contexte cellulaire a très rapidement montré qu'APC joue un rôle majeur dans plusieurs autres processus cellulaires. En effet APC est impliquée dans la stabilisation des microtubules (Mogensen *et al.*, 2002; Kroboth *et al.*, 2007), la régulation du cytosquelette de microtubules (Mogensen *et al.*, 2002; Reilein & Nelson, 2005) et l'établissement de la polarité liée à la migration (Etienne-Manneville & Hall, 2003; Mili *et al.*, 2008). APC joue également un rôle dans la polarité épithéliale, via probablement son interaction avec Dlg (Matsumine *et al.*, 1996; Mimori-Kiyosue *et al.*, 2007). De plus APC joue un rôle dans le fonctionnement des kinétochores (Fodde *et al.*, 2001; Kaplan *et al.*, 2001; Draviam *et al.*, 2006), dans le positionnement du fuseau mitotique (Green *et al.*, 2005) et dans certains systèmes non vertébrés directement dans l'orientation du fuseau mitotique (Yamashita *et al.*, 2003)(la difficulté d'extrapoler ces données aux mammifères est explicitée dans la partie 1.7.3 page 50). Tous ces rôles indiquent que les fonctions d'APC dépassent de loin son rôle dans la régulation de la voie Wnt. Une description exhaustive de toutes les fonctions d'APC dépasserait le cadre de cette introduction, seules seront décrites ici certaines des fonctions clés d'APC.

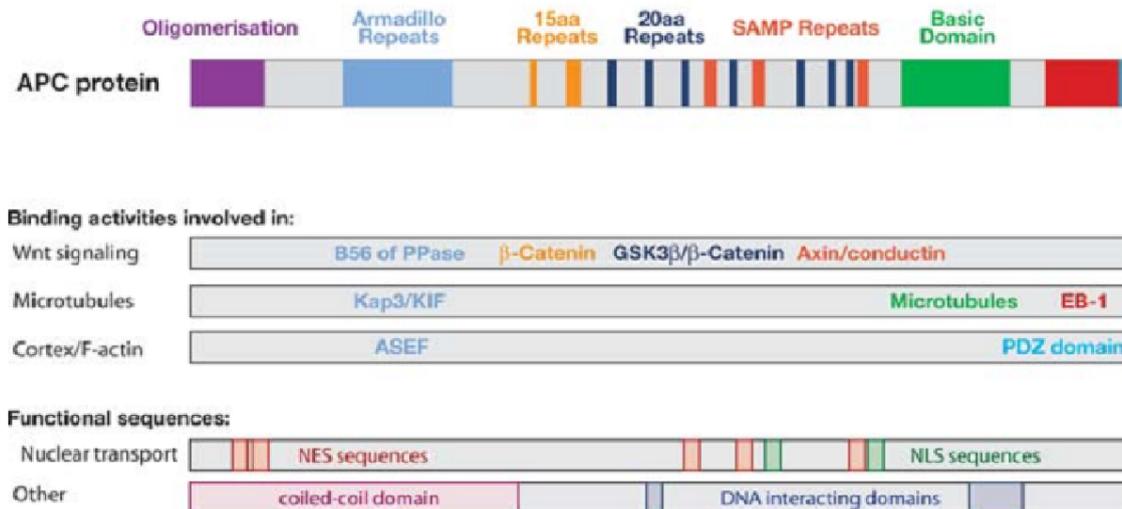


FIGURE 1.28 – Domaines et interactants d'APC

Représentation des différents domaines de la protéine APC et de leurs interacteurs respectifs. Le domaine PDZ permet la liaison à Dlg et l'interaction avec IQGAP1 dépend des domaines Armadillo. D'après (Nathke, 2004)

### 1.7.1 Domaines protéique et interactants d'APC

La protéine APC est composée de 2843 acides aminés, comprenant de nombreux domaines qui permettent son interaction avec des protéines fonctionnant dans des processus très variés. La protéine APC contient un domaine de dimérisation en  $N_{ter}$ , des répétitions de domaine Armadillo, trois ou quatre domaines similaires de 15 acides aminés impliqués dans sa liaison à la  $\beta$ -caténine, et sept domaines similaires de 20 acides aminés impliqués dans la liaison à la  $\beta$ -caténine et régulés par phosphorylation (par la PTK2 et la PP2A entre autres). La protéine APC contient également trois domaines SAMP (séquence Ser-Arg-Met-Pro) impliqués dans sa liaison à l'Axine, un domaine basique de liaison aux microtubules, un domaine de liaison à EB1, et un domaine PDZ en  $C_{ter}$  par lequel APC peut se lier à Dlg et Scribble, deux suppresseurs de tumeurs (cf figure 1.28). La protéine APC peut se lier à ASEF et augmenter son effet GEF, un **GEF** de Rac, à IQGAP1, et à Kap3, une protéine se liant aux kinésines KIF3A, par l'intermédiaire de ses domaines Armadillo, à la GSK3 $\beta$  ainsi qu'à la conductine/Axine. La protéine APC possède en plus des séquences d'import et d'export nucléaires (NLS et NES) ainsi qu'un site de liaison à l'ADN (Kouzmenko *et al.*, 2008).

Les multiples interactions possibles d'APC ont compliqué l'étude de ses fonctions cellulaires. La première interaction décrite pour la protéine APC est sa liaison à la  $\beta$ -caténine (Rubinfeld *et al.*, 1993). APC joue donc un rôle important dans la voie de signalisation Wnt, ce qui explique en partie son importance dans l'épithélium de la muqueuse colique.

## 1.7.2 Localisations d'APC

La fonction d'APC est souvent liée à sa localisation, ce paragraphe traite donc d'une partie des localisations intracellulaires de la protéine APC.

**Localisation interphasique** L'immunomarquage de cellules interphasiques épithéliales polarisées de mammifère montre trois localisations principales d'APC :

- aux extrémités des bouts  $\oplus$  de microtubules d'extensions cellulaires de cellules en migration
- à la membrane plasmique latérale
- à la membrane plasmique basale, selon des points et le long de microtubules

Avant de décrire les localisations de la protéine APC il est important de souligner la difficulté de localiser spécifiquement et précisément APC par immunocytochimie. En effet de nombreux anticorps ont été produits, que ce soit par des compagnies ou des groupes de recherche. Une étude récente a réévalué la qualité de ces anticorps par comparaison avec une protéine de fusion GFP, dont la localisation peut également être discutée, et a montré un certain nombre de localisations non spécifique (Brocardo *et al.*, 2005). De façon générale la localisation à la membrane apicale et un marquage excessif du noyau sont artefactuels. La difficulté d'obtenir avec précision la localisation intracellulaire d'APC représente donc un problème dans l'étude de ses fonctions.

Une localisation aux centrosomes a également été rapportée (Tighe *et al.*, 2001; Louie *et al.*, 2004; Langford *et al.*, 2006a). Des auteurs ont décrit une localisation d'APC préférentiellement au centriole mère (Louie *et al.*, 2004). Cette localisation n'est pas affectée par la troncature de la protéine après les motifs répétés Armadillo (Langford *et al.*, 2006a).

La localisation d'APC à l'extrémité de bouts  $\oplus$  de microtubules d'extensions cellulaires dans des cellule en migration est détaillée dans la partie traitant du rôle d'APC dans la polarité (cf partie "APC et la polarité" page 49).

Dans des cellules MDCK polarisées une partie de la protéine APC endogène se localise à la membrane plasmique latérale, de façon dépendante de l'actine et indépendante des microtubules (Rosin-Arbesfeld *et al.*, 2001; Langford *et al.*, 2006a). Dans des cellules issues de cancers colorectaux telles les SW480, qui n'expriment qu'une forme tronquée de la protéine APC, la localisation à la membrane plasmique n'est pas détectée (Rosin-Arbesfeld *et al.*, 2000). Une étude récente a précisé certaines localisations d'APC. Entre autre APC est localisée à la membrane plasmique latérale impliquée dans une jonction cellulaire cellule-cellule. De plus ces auteurs détectent APC à la membrane dans les cellules SW480 (Langford *et al.*, 2006a;b). Il est possible que la localisation d'APC à la membrane plasmique dépende en partie de sa liaison à Dlg (Langford *et al.*, 2006b), mais la localisation à la membrane plasmique d'une construction délétée du domaine nécessaire pour l'interaction avec Dlg indique que des mécanismes redondants interviennent (Langford *et al.*, 2006a).

APC peut également être localisée au cortex basal de la cellule (Rosin-Arbesfeld *et al.*, 2001; Mimori-Kiyosue *et al.*, 2000; Reilein & Nelson, 2005). Cette localisation est dépendante du cytosquelette de microtubules (Rosin-Arbesfeld *et al.*, 2001). Deux type de localisation d'APC au cortex basal sont décrites : une partie d'APC s'associe au cortex dans des zones dépourvues de microtubules, et l'autre partie d'APC est associée aux microtubules localisés le long de la membrane plasmique basale, APC étant localisée le long de ces microtubules et aux points d'intersection de microtubules entre eux (Reilein & Nelson, 2005). Cette localisation est similaire dans les cellules SW480, démontrant que cette localisation ne dépend pas de la partie  $C_{ter}$  de la protéine APC (Reilein & Nelson, 2005).

**Localisation en mitose** APC est localisée à la membrane (Langford *et al.*, 2006b). La localisation interphasique d'APC aux centrosomes (Tighe *et al.*, 2001; 2004; Louie *et al.*, 2004) n'est pas conservée en mitose (Tighe *et al.*, 2004).

APC est localisée aux kinétochores (Fodde *et al.*, 2001; Kaplan *et al.*, 2001). Durant l'anaphase APC est localisée aux microtubules polaires (Fodde *et al.*, 2001). Cette localisation d'APC aux kinétochores est abolie après traitement des cellules à la Colcemide (Fodde *et al.*, 2001) ou au Nocodazole (Kaplan *et al.*, 2001), impliquant les microtubules dans la localisation d'APC aux kinétochores. La localisation d'APC aux kinétochores est conservée dans des cellules de souris 1638T (exprimant un fragment  $N_{ter}$  de 1638 acides aminés) mais pas dans les cellules de souris Min (exprimant un fragment  $N_{ter}$  de 850 acides aminés) (Fodde *et al.*, 2001). La liaison à EB1 est perdue dans les deux fragments, mais la troncature à l'acide aminé 850 intervient dans la zone des répétitions armadillo, impliquées dans la liaison à Kap3 et ainsi aux kinésines KIF3A/KIF3B. La perte ou perturbation de ce domaine pourrait expliquer la différence de localisation d'APC aux kinétochores, via un transport dépendant des kinésines.

### 1.7.3 Quelques fonctions importantes d'APC

#### Rôle d'APC dans la régulation du cytosquelette de microtubules, l'attachement aux kinétochores et le positionnement du fuseau

Suite à la découverte de la localisation d'APC aux kinétochores, plusieurs groupes ont entrepris de décrypter le rôle d'APC aux kinétochores et la conséquence de l'expression de fragments tronqués. Parallèlement à la localisation d'APC aux kinétochores il a été montré que l'expression de fragments tronqués d'APC entraîne un défaut de liaison des microtubules aux kinétochores en mitose (Fodde *et al.*, 2001). De plus des cellules issues de souris porteuses d'une mutation pour *Apc* présentent des réarrangements chromosomiques et une aneuploïdie (Fodde *et al.*, 2001; Kaplan *et al.*, 2001).

Le rôle précis d'APC en mitose est loin d'être élucidé. Ainsi la localisation d'APC aux kinétochores suggère un rôle d'APC dans le contrôle de l'assemblage complet du fuseau

(ou **SAC** pour *Spindle Assembly Checkpoint*). Ce contrôle est régulé par la localisation de Mad et Bub aux kinétochores. Lorsque tous les kinétochores sont attachés par des microtubules kinétochoriens les reliant aux pôles, et qu'une force suffisante est exercée, ce contrôle est levé et la séparation des chromatides soeurs peut avoir lieu. Le traitement des cellules en mitose par des doses faibles de nocodazole (100 nm) diminue la liaison des microtubules aux kinétochores et déclenche un arrêt en métaphase (Draviam *et al.*, 2006). Des cellules traitées par ARN interférent contre APC sont également capables d'activer le contrôle de l'assemblage du fuseau, indiquant que celui-ci est fonctionnel en l'absence d'APC. Ainsi APC ne semble pas jouer un rôle prépondérant dans ce contrôle (Draviam *et al.*, 2006; Green *et al.*, 2005). Cette donnée est renforcée par la localisation correcte de Mad2 et BubR1 aux kinétochores dans les cellules déplétées pour APC (Draviam *et al.*, 2006).

Un rôle plus établi pour APC aux kinétochores est l'attachement correct des microtubules aux kinétochores. Les cellules déplétées pour APC ou exprimant une forme tronquée d'APC présentent une réduction de la distance inter-kinétochorienne, signe d'un défaut dans l'attachement des microtubules aux kinétochores (Tighe *et al.*, 2004; Green *et al.*, 2005; Draviam *et al.*, 2006; Dikovskaya *et al.*, 2007).

En plus de son rôle dans l'attachement des microtubules aux kinétochores APC est impliquée dans la régulation de l'orientation des paires de kinétochores. Le groupe de P. Sorger a ainsi montré que la déplétion d'APC entraîne une orientation aberrante des paires de kinétochore par rapport à l'axe du fuseau, défaut pouvant conduire à une aneuploïdie (Draviam *et al.*, 2006).

Les cellules exprimant un fragment tronqué d'APC ou déplétées pour APC présentent une plaque métaphasique moins condensée, suggérant un rôle d'APC dans l'alignement des chromosomes (Green *et al.*, 2005; Draviam *et al.*, 2006).

Enfin APC est impliquée dans le positionnement correct du fuseau au centre de la cellule en mitose. L'expression de fragments  $N_{ter}$  dans un contexte APC  $+/+$  ou la déplétion d'APC conduit à des problèmes de positionnement du fuseau (Green *et al.*, 2005; Draviam *et al.*, 2006). Il est difficile de conclure quand au rôle d'APC dans ce processus, à savoir si APC est directement impliqué dans ce processus ou si APC via sa liaison à EB1 va agir sur les microtubules astériens et ainsi être impliquée dans ce phénomène. C'est l'hypothèse avancée par le groupe de Kaplan, qui postule que les fragments tronqués d'APC agirait comme dominants négatifs en se liant à EB1 et inhiberaient en partie les fonctions d'EB1 dans la régulation de la dynamique des microtubules (Green & Kaplan, 2003; Green *et al.*, 2005). Cette dynamique étant capitale dans la régulation des contacts entre les microtubules astériens et le cortex, une diminution de cette dynamique peut conduire à des problèmes de positionnement.

## APC et la polarité

La polarité décrite dans cette partie traite de la localisation asymétrique de protéines impliquées dans un autre processus que l'orientation du fuseau pendant la mitose. La localisation de facteurs à un endroit précis de la cellule en migration permet la polarisation du réseau microtubulaire. La migration d'une cellule repose sur la formation de protrusions au niveau du front de migration qui précède le déplacement du reste de la cellule. Il a été montré qu'une cellule en migration réoriente le centrosome, l'appareil de Golgi et le cytosquelette par rapport à la direction de migration. De plus un enrichissement de divers facteurs importants pour la régulation de la dynamique des microtubules a lieu aux extrémités  $\oplus$  des microtubules localisés dans la protrusion, mécanisme reposant sur une polarisation du cytosquelette et de la cellule. Le rôle de la protéine APC dans ce processus est décrit ici.

Dans une culture confluente d'astrocytes de rat une blessure est réalisée à l'aide d'un cône ou micropipette de façon à créer une bande libre de cellules. Les cellules au bord de cette bande vont migrer pour occuper l'espace libre. Les microtubules qui contactent le front de migration d'une protrusion déclenchent un processus de polarisation. Dans un premier temps les intégrines activées vont recruter et activer Cdc42. Cette activation conduit au recrutement d'un complexe mPar-6-PKC $\zeta$ . Cette polarisation permet la réorientation du MTOC (Etienne-Manneville & Hall, 2001). PKC est activée au front de migration dans la protrusion par Cdc42 et Par6. PKC phosphoryle alors GSK, inactivant celle-ci et empêchant la phosphorylation d'APC. APC peut ainsi être localisée aux bouts  $\oplus$  Microtubule !bout  $\oplus$  des microtubules (Etienne-Manneville & Hall, 2003). Cette localisation d'APC aux bouts plus des microtubules est importante dans l'établissement de la polarité, l'expression d'une forme tronquée ne pouvant lier ni les microtubules ni EB1 (localisée également aux  $\oplus$  des microtubules dans la protrusion) diminuant la réorientation du centrosome (Etienne-Manneville & Hall, 2003). De plus l'interaction d'APC avec Dlg est importante non pas pour la localisation réciproque de ces deux protéines mais dans l'ancrage des microtubules avec la membrane plasmique, la réorientation du centrosome et la migration cellulaire (Etienne-Manneville *et al.*, 2005).

Dans des cellules MDCK non polarisées, la protéine APC est localisée à la périphérie des cellules, associée à des bouts  $\oplus$  Microtubule !bout  $\oplus$  de microtubules. Après traitement au nocodazole qui induit la dépolymérisation des microtubules cette localisation disparaît (Rosin-Arbesfeld *et al.*, 2001). Cette localisation est aussi partiellement dépendante du cytosquelette d'actine, APC étant moins localisée dans ces clusters après traitement des cellules à la Latrunculin A (Rosin-Arbesfeld *et al.*, 2001). De façon intéressante APC peut rester associée à un microtubule en état de dépolymérisation (Langford *et al.*, 2006a).

Un rôle supplémentaire d'APC a été décrit récemment. Certains ARN sont enrichis aux bouts  $\oplus$  Microtubule !bout  $\oplus$  de microtubules dans la protrusion de cellule en migration. Cette localisation polarisée dépend en partie d'APC (Mili *et al.*, 2008).

## L'expression d'APC entière dans un contexte APC tronquée provoque une polarisation apico-basale des cellules

M. Faux publie en 2004 des résultats décrivant l'obtention d'une lignée stable SW480 exprimant une forme entière d'APC (Faux *et al.*, 2004). Ces cellules sont dérivées d'un cancer du côlon et n'expriment normalement qu'un fragment tronqué de 1367 acides aminés. L'originalité de ce travail tient en deux choses : d'une part l'expression d'un fragment entier dans un contexte homozygote muté, là où la plupart des groupes expriment des fragments tronqués dans un contexte APC entier. Et d'autre part une expression très faible, là où les autres groupes expriment au mieux le transgène à des niveaux comparables si ce n'est bien supérieure à l'allèle endogène. L'expression de cette forme entière a des conséquences importantes sur le plan de la polarité, de l'expression génique et de certaines caractéristiques cellulaires. En effet l'expression d'APC provoque une relocalisation corticale de la  $\beta$ -caténine, normalement nucléaire dans les SW480 contrôles, et diminue la prolifération et la vitesse de migration. L'expression d'APC entraîne également une diminution de la signalisation de la voie Wnt. De plus cette expression d'APC entraîne des modifications post-traductionnelles de la E-cadhérine. La relocalisation de la  $\beta$ -caténine s'accompagne d'une augmentation de l'adhérence cellulaire, visible à la morphologie des cellules plus proches de cellules épithéliales que de fibroblastes. Il y a ainsi une forme de repolarisation de ces cellules. Ces deux lignées constituent un modèle de choix pour étudier l'effet de l'expression d'APC sur la polarité apico-basale, et les possibles effets en mitose, sur le comportement du fuseau notamment. Les résultats obtenus suite à l'étude de ce modèle sont décrits dans la partie résultats.

## APC2 : un homologue peu étudié

Il existe un gène nommé APC2 ou APCL codant pour une protéine très proche de l'APC (van Es *et al.*, 1999; Nakagawa *et al.*, 1999). Cette protéine conserve le domaine de dimérisation et une partie des domaines répétés armadillo et samp et des séquences de vingt acides aminés, mais pas le domaine basique et le site de liaison à Dlg. La protéine APC2 est capable de réguler négativement la voie de signalisation Wnt (van Es *et al.*, 1999). APC2 n'a pour l'instant pas été étudiée en détail, et son rôle potentiel dans la régulation des fonctions du cytosquelette reste inconnu. Il est néanmoins important de garder en tête l'existence de cette protéine dans l'analyse des travaux portant sur l'étude de la fonction d'APC par ARN interférent (Rusan & Peifer, 2008).

## Apc1 et Apc2 chez la Drosophile

Deux homologues d'APC existent chez la drosophile, dAPC1 et dAPC2. Ces protéines ne possèdent pas tous les domaines de la protéine APC humaine, en particulier ces protéines ne possèdent pas le domaine de liaison à EB1 et Dlg en  $C_{ter}$ . De plus APC2 ne

possède pas le domaine de liaison aux microtubules, et est exprimée majoritairement dans le système nerveux. Ces différences doivent être prises en compte lors de la mise en parallèle du rôle d'APC chez la *Drosophile* et dans les cellules de mammifères. Ces protéines présentent une conservation importante des domaines répétés Armadillo et SAMP, impliqués dans la liaison à la  $\beta$ -caténine. Au delà de leur rôle dans la régulation de la voie Wnt qui a été confirmée chez la *drosophile* (Ahmed *et al.*, 2002), APC1 et APC2 jouent un rôle dans le développement neuronal, comme en témoigne leur localisation asymétrique et la réduction importante du nombre de neuroblastes lié à la suppression des deux allèles. Cependant le rôle précis de chacune de ces protéines est difficile à établir, étant donné une redondance fonctionnelle partielle de leur fonction, et l'absence de phénotype marqué dans les embryons mutants pour l'un des deux allèles. Il est possible d'affirmer que malgré cette localisation asymétrique dans le neuroblaste APC2 n'est pas nécessaire au cours de cette division (Akong *et al.*, 2002b). La localisation asymétrique recouvre celle de Prospero et Miranda, et est complémentaire de celle d'Inscuteable et Bazooka (Akong *et al.*, 2002b). Un mécanisme possible est la liaison d'APC2 au complexe cadhérine-caténine, un fort enrichissement étant observé en interphase entre ces deux complexes. De même APC1 n'est pas impliquée dans les divisions asymétriques du neuroblaste, la localisation de protéines enrichies asymétriquement et la taille des cellules étant inchangées (Akong *et al.*, 2002b). Il est intéressant de noter qu'APC1 est retrouvée associée aux centrosomes en mitose (Akong *et al.*, 2002a). Une étude du développement d'embryons mutants pour APC1 ou APC2 a montré que l'allèle restant peut compléter en partie les fonctions de l'allèle délété (Akong *et al.*, 2002a).

Un autre rôle est attribué à APC chez la *drosophile*, dans le contrôle des divisions asymétriques dans le testicule. Dans ce modèle les cellules souches se divisent perpendiculairement à un 'pivot' et donne naissance à une cellule souche et une cellule gonoblaste qui initie la différenciation en spermatozoïde. Dans ce système APC2 est enrichie à l'interface entre la cellule souche et le 'pivot'. APC1 s'associe aux centrosomes. Des mutants pour APC2 présentent un défaut d'orientation des divisions. Il est possible qu'APC2 enrichie à l'interface pivot-cellule souche serve à capturer les microtubules astériens en mitose et participe ainsi à l'orientation du fuseau pour produire une division asymétrique (Yamashita *et al.*, 2003).

## 1.8 L'adhésion dans la régulation de l'orientation du fuseau mitotique

Plusieurs articles récents établissent un lien entre l'adhésion cellulaire interphasique et l'orientation du fuseau mitotique. Cette partie résume les éléments essentiels de ces travaux.

### 1.8.1 Influence de l'adhésion sur l'organisation interne de la cellule et l'orientation du fuseau mitotique

D'une façon générale la forme cellulaire dicte l'orientation du fuseau mitotique. Le fuseau peut se réorienter en réponse à un changement induit de la forme de la cellule (O'Connell & Wang, 2000). Cependant l'orientation du fuseau n'est pas que régie par la forme de la cellule et dans certains cas d'autres forces orientent le fuseau indépendamment de la forme de la cellule. C'est le cas pour certaines divisions durant le développement du poisson zèbre, où des fuseaux s'orientent indépendamment de l'axe long de la cellule et de la direction générale de migration du tissu (Concha & Adams, 1998). Ceci soulève des questions sur le lien entre l'adhésion en interphase, la forme interphasique de la cellule et l'orientation du fuseau en mitose. Dans l'optique de mieux comprendre les relations existants entre l'adhésion et l'orientation du fuseau l'équipe de Michel Bornens à l'institut Curie a développé une technique de culture cellulaire permettant de contrôler l'adhérence cellulaire et ainsi d'étudier l'organisation interne de la cellule. L'observation d'un grand nombre de cellules permet de décrire l'organisation interne moyenne d'une cellule en rapport à l'adhésion et d'observer les conséquences sur l'orientation du fuseau mitotique.

La microfabrication, combinée à un traitement de surface, permet la création de motifs de la taille d'une cellule. Le motif est revêtu de protéines de l'adhésion cellulaire telle la fibronectine qui contrôle l'adhésion de la cellule sur le motif. Il est possible de faire varier la forme du motif ainsi que les protéines adsorbées sur celui-ci. L'observation de plusieurs événements permet une description de l'organisation interne moyenne de la cellule en relation avec l'adhésion, et de conclure quand au lien entre cette organisation et l'orientation du fuseau en mitose. La polarité cellulaire signifie ici l'établissement de domaine corticaux et non la localisation de déterminants cellulaires ségrégués dans les divisions asymétriques.

Les cellules HeLa ont été utilisées dans cette étude, ces cellules s'arrondissant complètement en mitose. Cette caractéristique élimine de fait les artefacts de forme et rend possible une étude sur l'organisation interne et non l'importance de la forme. Une cellule qui adhère sur un motif adopte une forme qui correspond à l'enveloppe convexe du patron adhésif (Thery & Bornens, 2007). Il est possible de faire varier les points d'ancrage de la cellule sur le patron tout en conservant une forme équivalente. Cette approche permet de différencier les effets dus à la forme de la cellule de ceux liés aux points d'ancrage.

Les cellulesensemencées sur un motif circulaire présentent une orientation aléatoire du fuseau en mitose, indiquant qu'il n'existe pas de biais pour l'orientation du fuseau. Lorsque les cellules sontensemencées sur un motif en forme de triangle ou de L, l'orientation du fuseau n'est plus aléatoire. L'orientation du fuseau se fait selon l'hypoténuse du triangle ou du L. L'analyse de l'organisation du cytosquelette d'actine et des protéines impliquées dans l'adhésion telles la cortactine et l'eitrine a révélé une hétérogénéité corticale des cellules interphasiques. Cette hétérogénéité est dictée par l'adhésion de la cellule sur le

motif sous-jacent. L'actine s'organise en fonction de la forme du patron adhésif et des zones d'adhésion ou non au patron. Le long d'un bord adhésif l'actine polymérise en un réseau branché et est organisée en protrusion membranaire sans adhésion en points focaux. Le long d'un bord non adhésif l'actine s'organise en fibre de stress, organisées parallèlement au bord. L'eitrine et la cortactine reflètent l'organisation de l'actine. La cortactine participe à la polymérisation de l'actine dans les lamellipodes. L'eitrine est une protéine de liaison entre la membrane plasmique et l'actine corticale. Ces deux protéines s'accumulent majoritairement dans les zones où l'actine forme des protrusions. Dans les zones non adhésives ces protéines sont quasiment absentes (Thery *et al.*, 2005)(cf figure 1.29).

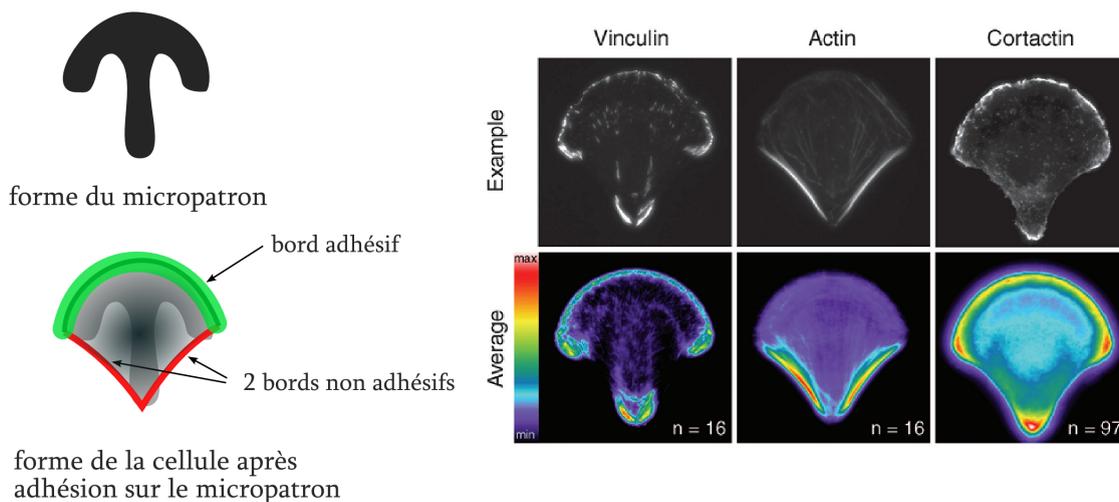


FIGURE 1.29 – Hétérogénéité corticale dictée par l'adhésion

Exemple d'immunomarquage pour la Vinculine, l'Actine et la Cortactine de cellules adhérentes sur un micropatron. Le moyennage sur plusieurs cellules est représenté dans la ligne du bas. L'Actine est assemblée en fibres de stress au niveau des bords non adhésifs. À l'inverse l'Actine polymérise dans la membrane au niveau des bords adhésifs. D'après (Thery *et al.*, 2006)

L'adhésion au motif dicte l'organisation interne de la cellule et provoque une hétérogénéité corticale. Au moment de l'entrée en mitose la cellule s'arrondit et perd sa forme interphasique. Cependant les protéines eitrine et cortactine sont retrouvées dans les fibres de rétraction lorsque la cellule s'arrondit. La cortactine est détectée au cortex, et son organisation reflète la situation interphasique. Autrement dit l'hétérogénéité corticale est conservée en mitose (Thery *et al.*, 2005). La diminution de la dynamique de l'actine par l'utilisation de PP2, un inhibiteur de tyrosine kinase de la famille Src abolit l'hétérogénéité corticale. Dans ces cellules l'orientation du fuseau est fortement perturbée par rapport à la situation normale qui possède un axe majeur, l'orientation étant alors presque aléatoire. Ceci montre que cette hétérogénéité corticale est directement impliquée dans l'orientation du fuseau. Il existe donc un lien entre les zones d'adhésion de la cellule, l'établissement d'une hétérogénéité corticale, la transmission de ces domaines en une empreinte corticale

et l'orientation du fuseau en mitose (cf 1.30).

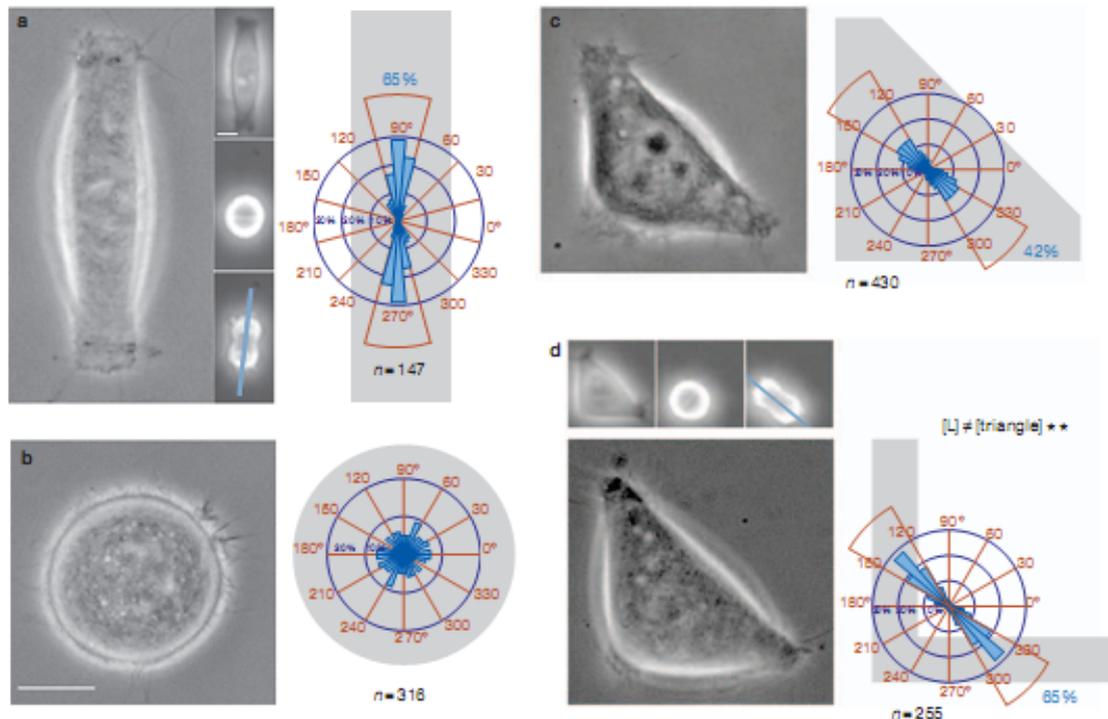


FIGURE 1.30 – L'Orientation du fuseau est dictée par l'adhésion interphasique

Lorsque la cellule adhère sur un micropatron n'entraînant pas d'hétérogénéité corticale l'orientation du fuseau est aléatoire (b). A l'inverse lorsque l'adhésion sur un micro-patron impose une hétérogénéité corticale par des sites d'adhésion précis, l'orientation est dictée par cette hétérogénéité. La forme interphasique n'est pas le seul paramètre, car les orientations sont différentes dans le cas du triangle (c) et du L (d), malgré une forme interphasique comparable. Les graphes circulaires superposés sur la forme des patrons montrent la distribution angulaire de l'orientation des fuseaux. D'après (Thery *et al.*, 2005)

L'organisation du cytosquelette d'actine est dictée par les zones d'adhésions au substrat. L'actine forme un réseau polymérisé dans les zones de protrusion où la cellule adhère et un réseau contractile de fibre de stress le long des bords non adhérents. Cette organisation polarisée a des conséquences sur la localisation d'autres protéines, telle APC. APC est localisée dans les cellules polarisées le long des zones d'adhésion et absente des zones non adhérentes (Thery *et al.*, 2006). Cette polarisation de la cellule a des conséquences sur le cytosquelette des microtubules. Le cytosquelette de microtubules est lui aussi polarisé, avec une densité de microtubules moindre dans les zones non adhérentes. Les microtubules présentent un comportement différent suivant qu'ils entrent en contact avec la membrane d'une zone adhérente ou non adhérente. Les microtubules cessent de polymériser au contact d'une zone adhérente. Au contraire les microtubules ne s'arrêtent pas au contact d'une zone non adhérente, continuent de polymériser le long de la zone non adhérente jusqu'à une zone adhérente. Les microtubules sont donc dirigés vers les zones adhérentes où ils s'accumulent (Thery *et al.*, 2006). La présence d'APC dans ces mêmes

zones suggère une stabilisation des microtubules par interaction avec APC. Le rôle de ces zones enrichies en APC avec l'orientation du fuseau en mitose n'est pas élucidée.

### 1.8.2 Rôle de la signalisation des intégrines dans l'alignement du fuseau

L'étude des liens entre l'adhésion cellulaire et l'orientation du fuseau a révélé un rôle de la signalisation dépendante des intégrines. Ce paragraphe traite du phénomène d'alignement des deux pôles dans un plan parallèle au substrat, phénomène qui précède l'orientation du fuseau. Pour une revue complète sur cette thématique consulter Toyoshima & Nishida (2007b).

Le rôle de la signalisation dépendante des intégrines a été mise en évidence chez la drosophile dans les cellules épithéliales folliculaires de l'ovaire qui entourent les cellules germinales. Les cellules épithéliales folliculaires sont organisées en une monocouche. La suppression d'une sous-unité  $\beta$  provoque une stratification de l'épithélium. Cette stratification n'est pas une conséquence d'une perturbation de la polarité apico-basale. En effet la polarité apico-basale est conservée, mais l'alignement planaire est perturbé. Ceci conduit à une stratification. Le point capital dans ce processus semble être la signalisation dépendante des intégrines, plus que l'adhésion à la matrice extra-cellulaire (Fernandez-Minan *et al.*, 2007)(cf figure 1.31).

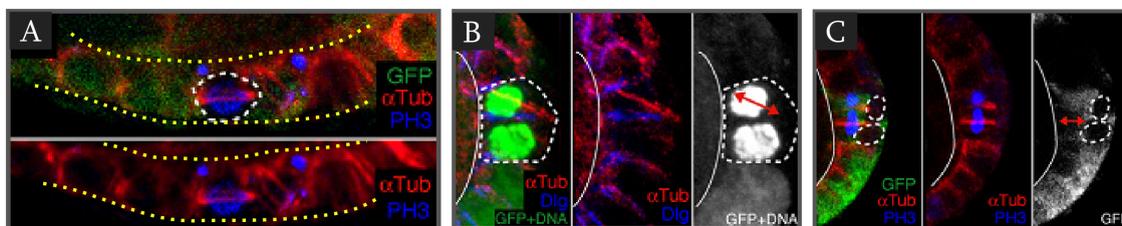


FIGURE 1.31 – Rôle de la signalisation dépendante des intégrines dans l'alignement planaire du fuseau

A : le fuseau s'aligne parallèlement au plan de l'épithélium dans les cellules de l'épithélium folliculaire, ce qui conduit au maintien de la couche unicellulaire. Le plan de l'épithélium est symbolisé par les pointillés jaunes. B et C : suite à une mutation dans une intégrine l'alignement planaire est perturbé, ce qui se traduit par la présence de deux cellules dans la hauteur de l'épithélium et un début de stratification (C). Les cellules mutantes pour l'intégrine sont entourées de pointillés blancs (B et C), et les orientations des fuseaux sont représentées par les flèches rouges. D'après (Fernandez-Minan *et al.*, 2007)

L'alignement des deux pôles dans un plan parallèle au substrat a lieu dans des cellules HeLa non confluentes (Toyoshima & Nishida, 2007a). Les jonctions intercellulaires ne sont donc pas nécessaires à l'alignement du fuseau (Toyoshima & Nishida, 2007a; Fujiwara *et al.*, 2008). La perturbation de l'adhésion dépendante des intégrines provoque un problème d'alignement des deux pôles. Le cytosquelette d'actine est également requis

pour un alignement correct des deux pôles (Toyoshima & Nishida, 2007a). Les auteurs confirment le rôle des microtubules astériens dans les processus touchant à l'orientation et au positionnement du fuseau, l'inhibition spécifique de leur dynamique par l'utilisation de dose faible de nocodazole entraîne un problème d'alignement des pôles. Les cellules traitées par la technique d'ARN interférent dirigée contre EB1 présentent également une dérégulation de l'alignement du fuseau. Au vu du rôle majeur d'EB1 dans la dynamique des microtubules on peut considérer que ces données confirment le rôle des microtubules astériens. La myosine X est également impliquée dans ce processus via son rôle sur l'organisation du cytosquelette d'actine en mitose (Toyoshima & Nishida, 2007a). Le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PtdIns(3,4,5)P3) est également impliqué dans l'alignement du fuseau. L'inhibition de la PI(3)K provoque un problème d'alignement des pôles (Toyoshima *et al.*, 2007). Ce mécanisme d'alignement des pôles opère également dans les MDCK, cellules épithéliales polarisées (Reinsch & Karsenti, 1994). L'inhibition de la PI(3)K dans ces cellules n'entraîne pas de problème d'alignement du fuseau, ce qui tend à démontrer l'existence de mécanismes parallèles dans les cellules épithéliales. De même que l'inhibition de PI(3)K provoque un problème d'alignement, la surexpression de PtdIns(3,4,5)P3 obtenue par inhibition de la phosphatase PTEN qui déphosphoryle D3 de PtdIns(3,4,5)P3 provoque un problème d'alignement (Toyoshima *et al.*, 2007).

L'étude de l'alignement du fuseau dans des cellules épithéliales des bronches humaines (Normal Hepithelial Bronchial Epithelial, NHBE) a montré un rôle de la signalisation dépendante du hyaluronane (**HA**) dans l'alignement du fuseau. Le hyaluronane est un polysaccharide présent dans les tissus conjonctifs, épithéliaux et neuraux. Le hyaluronane est un composant majeur de la matrice extracellulaire. Les cellules NHBE présentent un problème d'alignement des pôles lorsqu'elles sont cultivées sur de la poly-L-lysine qui inhibe la signalisation basale dépendante des intégrines. L'ajout de HA de haut poids moléculaire sur ces cellules restaure un alignement normal du fuseau (Fujiwara *et al.*, 2008). Cette restauration d'un phénotype normal passe par le récepteur membranaire CD-44. CD-44 est une protéine importante dans l'adhésion et se lie aux protéines ERM, Ezrine, Radixine, et Moésine. Les cellules cultivées sur poly-l-lysine, en présence de HA et d'un inhibiteur de CD-44 présentent un problème d'alignement du fuseau comme dans la situation où HA est absent. Ceci montre que CD-44 est nécessaire à la signalisation débouchant sur l'alignement du fuseau. La signalisation HA apicale est différente de la signalisation basale. Lorsque les cellules sont exposées simultanément au HA dans le milieu (exposition apicale) et sur le substrat (exposition basale) sur de la poly-l-lysine l'alignement du fuseau est perturbé. De plus l'addition de HA sur le substrat uniquement avec la poly-l-lysine augmente la rotation du fuseau. HA est donc capable d'induire deux comportements différents au fuseau suivant qu'il est en contact du pôle apical ou basal de la cellule (Fujiwara *et al.*, 2008). La signalisation de HA via CD-44 repose en partie sur ROCK, dont la surexpression a été montrée responsable d'un détachement des cellules en

culture suite à un problème d'orientation du fuseau (Vasiliev *et al.*, 2004). Ces données montrent donc l'importance de la régulation de l'orientation du fuseau à travers le contrôle du cytosquelette.

### 1.8.3 Quelques exemples de problèmes dus à une dérégulation du contrôle de l'orientation

Plusieurs gènes impliqués dans la *Planar Cell Polarity* (**PCP**) influencent également le processus d'OCD. Un modèle intéressant est celui du tube rénal. La longueur du néphron augmente au cours du développement mais pas son diamètre. Cette augmentation de longueur se fait par un processus de division orienté selon l'axe long du tube. Ces divisions orientées sont sous contrôle de la PCP, imposée par la voie Wnt non canonique, c'est à dire passant par Dishevelled mais n'aboutissant pas à la transcription des gènes de la voie Wnt. Dans le cas de polykystose (dilatation tubulaire) une perturbation de l'orientation du mécanisme d'OCD entraîne une dilatation du tube (Fischer *et al.*, 2006).

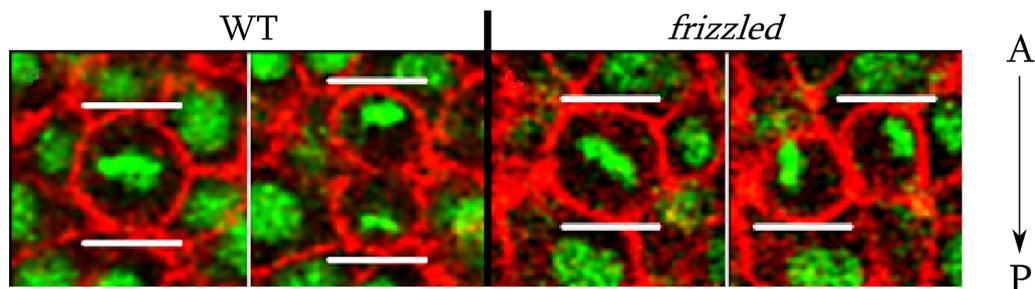


FIGURE 1.32 – Allongement du tissu chez le poisson Zèbre

Dans un embryon sauvage les divisions sont orientées selon l'axe antéro-postérieur et contribuent à l'allongement du tissu. Dans les mutants *frizzled* les divisions ne sont plus orientées et cela provoque un défaut d'allongement du tissu. Vert : H2B-GFP, Rouge : membrane-RFP, A : antérieur, P : postérieur. D'après (Gong *et al.*, 2004)

Les divisions asymétriques peuvent être perturbées par le biais des gènes importants dans l'établissement de la PCP. Ainsi la division orientée dans le développement de l'organe sensoriel chez la drosophile (**SOP**, cf paragraphe "Sensory Organ Precursor" page 14) est sous le contrôle de la PCP. De même dans le neuroépithélium de drosophile il existe un processus de division orientée. La perturbation de ce processus entraîne un problème de développement du système nerveux. Il a également été montré que l'induction de la croissance tumorale chez la drosophile pouvait se faire via une perturbation des divisions asymétriques de cellules souches (Caussinus & Gonzalez, 2005). Autrement dit les processus d'établissement et de maintien de la polarité cellulaire et les mécanismes contrôlant l'orientation peuvent être directement reliés au cancer. On peut aussi citer

l'exemple du poisson zèbre où l'augmentation de la longueur du tissu au cours du développement se fait grâce au mécanisme de divisions orientées. Une mutation dans le gène *frizzled* entraîne une perturbation de ces divisions orientées et ainsi une diminution de l'allongement global du tissu (cf figure 1.32 page précédente).

La peau est un système intéressant dans l'étude des divisions asymétriques couplé à un processus d'adhésion. Il s'agit d'un épithélium stratifié, dont le renouvellement repose sur des divisions asymétriques de cellules progénitrices. La perturbation de l'adhésion des cellules à la matrice sous jacente entraîne des problèmes d'orientation des fuseaux (Lechler & Fuchs, 2005).

## Chapitre 2

# Cancer du côlon et morphogenèse

Le cancer du côlon compte parmi les cancers les plus graves en terme d'incidence et de mortalité, avec 412 900 nouveaux cas diagnostiqués et 207 400 morts en Europe pour l'année 2007 (Ferlay *et al.*, 2007). Le cancer du côlon progresse suivant la séquence de Vogelstein, qui consiste en des mutations successives dans des gènes suppresseurs de tumeurs tels qu'APC, Ki-ras, p53 (Fearon & Vogelstein, 1990). Ce modèle ne semble cependant pas être l'unique voie conduisant au cancer du côlon, certaines tumeurs ne présentant pas de mutations dans ces gènes clés ou très rarement des mutations dans l'ensemble de ces gènes. En effet l'analyse de tumeurs a montré qu'il est rare de trouver des mutations pour Ki-ras et p53 (Slattery *et al.*, 2002) ou APC, Ki-ras et p53 simultanément (Smith *et al.*, 2002; Samowitz *et al.*, 2008). Les étapes les plus précoces débutent vraisemblablement par la formation de cryptes aberrantes ou ACF (Aberrant Crypt Foci), dont certaines évoluent en polypes avant de finalement progresser vers le stade malin d'adénocarcinome. Ainsi, si l'identification des gènes clés dans ces processus de carcinogenèse et de modifications histologiques est relativement satisfaisant, peu de choses sont connues sur les mécanismes cellulaires les plus précoces qui vont permettre la formation de ces ACFs et de ces polypes. Il apparaît capital de mieux décrire cette étape initiale afin de rechercher quels sont les mécanismes cellulaires responsables ou indicatifs de l'initiation du processus cancéreux dans le cancer colorectal. Nous nous sommes intéressés à la situation de crypte d'apparence saine, et avons étudié dans ce contexte l'orientation et le positionnement du fuseau. Ceci nous a permis de décrire la situation normale, et de comparer cette situation avec des cryptes de plusieurs modèles murins porteurs d'une mutation dans le gène Apc predisposant au cancer du côlon. Nous avons finalement pu étudier ces paramètres dans des ACF et dans des cryptes délétées pour Apc.

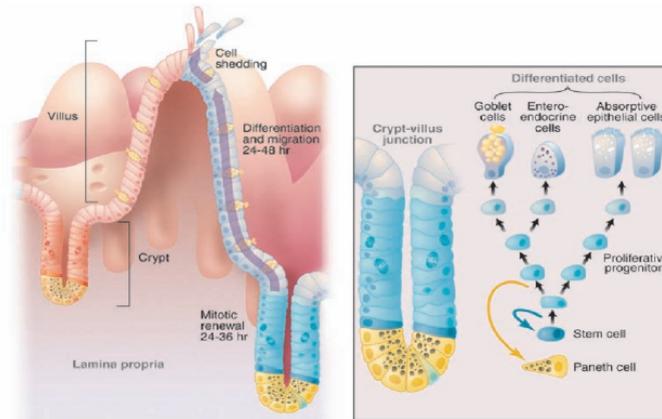


FIGURE 2.1 – Organisation de la muqueuse intestinale

Dans l'intestin grêle l'épithélium est organisé par les cryptes (partie basse) et les villus (partie haute), prolongement des cryptes. Les cellules souches, par une division asymétrique donne une cellule souche et une cellule proliférative transitoire, ou une cellule de Paneth, qui va migrer vers le fond de la crypte. Les cellules prolifératives migrent vers le haut de la crypte et se différencient en cellules caliciformes, cellules entéroendocrines. La situation est différente dans le côlon, par l'absence de villus et des cellules de Paneth. D'après (Radtke & Clevers, 2005)

## 2.1 Description du tissu normal

### 2.1.1 La muqueuse colique

La muqueuse colique est constituée d'une monocouche de cellules épithéliales au contact de la lumière de l'intestin. La fonction principale du côlon chez l'adulte consiste en l'absorption d'eau et d'ions. Cet épithélium s'invagine dans le chorion sous-jacent pour former les cryptes, tubes ouvert à une extrémité sur la lumière de l'intestin et qui sont les unités fonctionnelles du côlon. Ces structures permettent d'augmenter la surface d'échange avec le milieu extérieur, et sont le siège du processus de renouvellement de l'épithélium. Les cryptes sont séparées l'une de l'autre par un épithélium plat, à la différence de l'intestin grêle où l'épithélium entre deux cryptes forme une digitation dans la lumière appelée villus (figure 2.2 page suivante).

La muqueuse colique présente au niveau macroscopique un agencement de cryptes très dense. L'ensemble repose sur une fine couche musculaire lisse, la muqueuse musculaire. Dans cette introduction nous nous intéresserons essentiellement à la biologie des cryptes et de leur épithélium.

### 2.1.2 Dynamique et composition de l'épithélium des cryptes

L'épithélium des cryptes est composé de plusieurs types cellulaires :

- les cellules souches
- les cellules en gobelet (ou cellules caliciformes)
- les cellules entéroendocrines

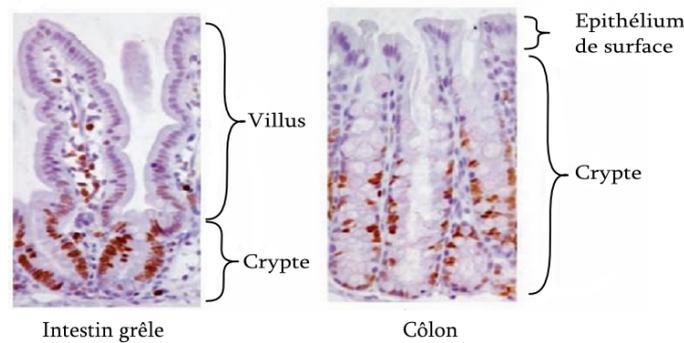


FIGURE 2.2 – Comparaison de l'organisation de la muqueuse de l'intestin grêle et du côlon

Dans l'intestin grêle les cryptes sont petites et prolongées par un villus de taille importante. La situation est différente dans le côlon, par l'absence de villus et des cellules de Paneth. Les cryptes sont plus grandes dans le côlon. D'après (Radtko & Clevers, 2005)

Les cellules souches jouent un rôle clé dans l'homéostasie des cryptes et font l'objet du paragraphe "Les cellules souches" (p71). Les cellules caliciformes sécrètent un mucus protégeant l'épithélium. Les cellules enteroendocrines sécrètent diverses hormones (sérotonine, endorphine, somatostatine) qui jouent un rôle dans la régulation de processus lié au fonctionnement de l'intestin, comme la somatostatine qui va inhiber l'activité motrice gastro-intestinale et la sécrétion d'autres hormones. La crypte est le siège d'une grande variété de processus cellulaires : on observe en effet dans ce système morphogénétique à la fois des phénomènes de division, de migration, de différenciation, et d'apoptose. Chacun de ces processus est restreint à des compartiments bien définis spatialement : on retrouve ainsi à la base des cryptes des divisions asymétriques de cellules souches, plus haut dans la crypte des processus de divisions *a priori* symétriques et un processus de migration vers la surface associé à la production, par différenciation, des cellules dans les différents types composant la muqueuse colique, et enfin au niveau de l'épithélium de surface les processus d'apoptose et d'anoïkis. Les cellules souches se divisent rarement, et de façon asymétrique pour donner une cellule souche et une cellule transitoire ou transient amplifying cell, qui prolifèrent rapidement. Ces cellules se divisent plusieurs fois, et il semble qu'elles perdent progressivement au cours des divisions successives certaines caractéristiques des cellules souches. Autrement dit les premières cellules issues de la division asymétrique des cellules souches auraient le potentiel d'assurer le renouvellement de la crypte si les cellules souches venaient à disparaître (Potten, 1977; Merritt *et al.*, 1994). Les cellules transitoires cessent de se diviser après plusieurs cycles pour se différencier et en même temps migrer vers l'épithélium de surface. Finalement les cellules différenciées qui atteignent l'épithélium de surface sont expulsées dans la lumière de l'intestin et meurent. La muqueuse colique est un tissu extrêmement dynamique puisqu'il faut seulement cinq jours chez l'Homme pour renouveler l'intégralité de l'épithélium (par comparaison le renouvellement de l'épithélium des poumons peut prendre jusqu'à six mois) (Blenkinsopp, 1967; Wright & Irwin, 1982).

Une cellule nouvellement formée va donc rester cinq jours dans l'épithélium de la crypte avant d'être expulsée.

## 2.2 Mise en place du tissu au cours de l'embryogenèse et parallèle avec la tubulogenèse

La crypte n'est pas à proprement parler un tube puisqu'elle est fermée à une extrémité. Il est cependant intéressant de rechercher les similitudes mais aussi les différences existant entre le système morphogénétique de la crypte et les modèles de tubulogénèse tels que le rein ou le poumon chez la souris. Une première similitude réside dans le développement d'une forme d'aspect tubulaire, impliquant une lumière centrale, mais dans le cas précis de la crypte le maintien de cette forme est associé à une prolifération intense, à l'inverse de la plupart des systèmes tubulaires où la prolifération est peu présente. Une autre similitude réside dans la formation d'un lumen interne formé par les pôles apicaux des cellules (dans le cadre d'un tube constitué de plusieurs cellules), et l'établissement de jonctions inter-cellulaires assurant la continuité du lumen. L'étude de la tubulogenèse a également montré l'importance de l'établissement de la polarité apico-basale des cellules constituant le tube. La formation du lumen dans un amas de cellules MDCK en culture dans du colagène a permis de montrer précisément le rôle de l'établissement de la polarité apico-basale dans le processus de formation du lumen (Martin-Belmonte *et al.*, 2008).

### 2.2.1 Embryogenèse du côlon

La majeure partie de l'intestin dérive de l'endoderme définitif et du mésoderme splanchnique. L'endoderme forme l'épithélium de la muqueuse colique, le mésoderme forme le muscle lisse sous-jacent et l'ectoderme est inclus dans les parties les plus proximales et distales du tube digestif ainsi que dans le système nerveux entérique. L'organogenèse de l'intestin commence par deux invaginations, la première ayant lieu au niveau antérieur de l'embryon, formant l'**AIP** (*Anterior Intestinal Portal*) et la seconde au niveau postérieur formant la **CIP** (*Caudal Intestinal Portal*). Ces deux invaginations vont croître et s'allonger pour finalement se rencontrer et fusionner au sein de l'embryon. L'intestin en formation va alors être segmenté d'abord suivant l'axe antéro-postérieur, pour finalement être segmenté suivant plusieurs axes :

- antéro-postérieur
- dorso-ventral
- gauche-droite
- radial

Le développement de l'endoderme se fait sous le contrôle conjoint de facteurs de transcriptions (*Sox*, *Hox*) et de voies de signalisations (*Sonic hedgehog*, *Indian hedgehog*,

BMPs). L'étude du développement de l'endoderme et du mésoderme cultivés séparément après dissection a montré l'importance de l'interaction entre ces deux tissus, l'intestin ne pouvant se former en l'absence de contact entre ces deux tissus (Haffen *et al.*, 1987). Le feuillet endodermale intestinal va former l'épithélium intestinal, caractérisé par l'axe crypte-villus disposé radialement. L'endoderme va subir des modifications morphologiques par une réorganisation progressive en colonne accompagnée par une excroissance du mésoderme sous-jacent. Le tout aboutissant à la formation des villi (cf figure 2.3).

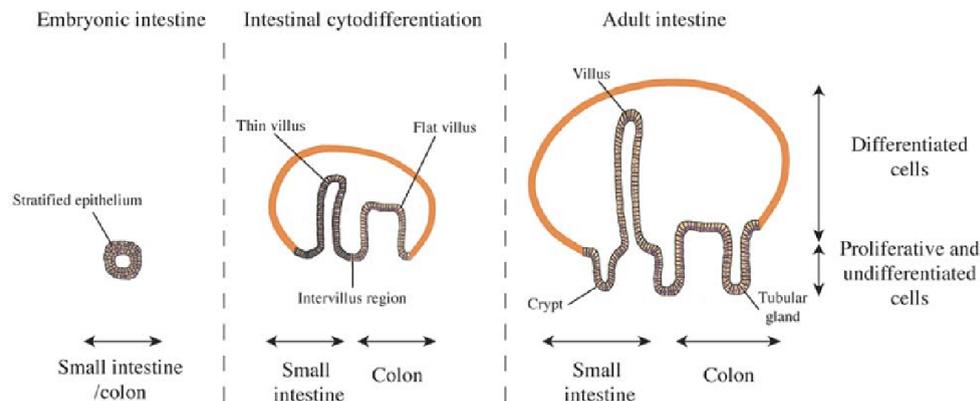


FIGURE 2.3 – Embryogenèse du côlon

Au cours du développement l'épithélium du futur intestin comporte des villus fins dans l'intestin grêle et des villus plats dans le côlon. Ces villus sont séparés par un épithélium prolifératif. Cet épithélium va changer de forme pour donner les cryptes dans l'épaisseur de la muqueuse. Les villus embryonnaires ne sont plus présents à l'âge adulte, si bien que le côlon adulte consiste en un épithélium plat perforé par les orifices des cryptes. D'après (de Santa Barbara *et al.*, 2003).

L'épithélium du côlon se caractérise par la présence de villi plats. Les villi sont séparés par un épithélium inter-villus prolifératif. Au fur et à mesure que l'intestin se forme l'épithélium inter-villus va changer de forme et donner naissance aux cryptes par déformation dans l'épaisseur de la muqueuse. Finalement à l'âge adulte les villi embryonnaires seront perdus si bien que le côlon adulte consiste en un épithélium plat perforé par les orifices des cryptes. A l'âge adulte plusieurs voies de signalisations contrôlent l'homéostasie de la crypte, parmi lesquelles la voie Wnt canonique qui va permettre le maintien du compartiment prolifératif des cryptes (Korinek *et al.*, 1998). La voie de signalisation BMP joue un rôle dans le contrôle de la différenciation au sein du tissu adulte (Howe *et al.*, 2001). L'inhibition de la voie BMP par l'expression de Noggin entraîne la formation *de novo* de cryptes au niveau des villus dans le petit intestin (Haramis *et al.*, 2004). La voie BMP régule le nombre des cellules souches via une inhibition de la voie Wnt dans la niche, empêchant ainsi une duplication incontrôlée et extension du compartiment des cellules souches (He *et al.*, 2004) (cf 'Les voies de signalisation Wnt et Notch' page 66).

## 2.2.2 Crypte et tubulogénèse

La crypte adulte peut être considérée comme le résultat d'un processus morphogénique permanent, dans la mesure où l'établissement mais surtout le maintien de cette structure chez l'adulte est le résultat d'une régulation de la morphogénèse. Les recherches sur ce système ont porté principalement sur l'étude des voies de signalisation régulant l'homéostasie de la crypte, via le compartiment prolifératif et les cellules souches. Nous avons vu que la crypte s'apparente à un tube dont la longueur et le diamètre doivent être maintenus constants. Or un des points centraux de l'étude de la tubulogénèse a été de décrypter les mécanismes responsables de l'organisation de cellules en un tube et de comprendre comment la taille et la forme de celui-ci sont régulés. Il est donc justifié d'utiliser les connaissances acquises à partir de l'étude des divers modèles de tubulogénèse pour essayer de comprendre comment la morphogénèse des cryptes est elle-même régulée. Le parallèle avec les premières étapes de cancer du côlon est pertinent d'un point de vue architectural, la formation de cryptes aberrantes et polypes résultants de mutations génétiques pouvant perturber l'architecture tissulaire.

### Généralités sur la tubulogénèse

La tubulogénèse est la formation d'un tube au sein d'un organisme. Un tube est composé par une cavité au sein d'un groupe de cellules ou d'une cellule, et permet la circulation de fluides ou gaz. Le lumen du tube est composé par les parties apicales des cellules, les pôles basaux étant orientés vers l'extérieur du tube. Il existe trois types de tubes : pluricellulaires, unicellulaire avec une jonction et unicellulaire sans jonction. Les mécanismes d'établissement du tube sont variés, et incluent la formation d'un tube à partir d'un épithélium ("wrapping"), le bourgeonnement, la formation d'une cavité par mort cellulaire des cellules à l'intérieur d'une masse de cellules, la formation du tube par réarrangement spatial des cellules ("hollowing") et la formation d'un tube par la réorganisation architectural d'une seule cellule ("cell hollowing")(voir la figure 2.4 page suivante).

Une des différences majeure entre ces mécanismes est l'état de polarisation des cellules épithéliales utilisées pour former le tube. La régulation de ces processus morphologiques d'aspect très varié implique en fait une série limitée de paramètres clés : l'établissement de la polarité apico-basale, elle-même sous contrôle de la sécrétion et de la biogénèse de la membrane apicale, l'établissement des jonctions intercellulaires autour du lumen nouvellement formé, et la régulation de la taille du tube. Le point capital dans la constitution d'un tube est la formation du lumen qui dépend directement de l'établissement de la polarité apico-basale. En l'absence de cette polarité au moment de la formation du tube, une sécrétion polarisée va permettre la formation de la membrane apicale par l'incorporation de protéines et lipides nouvellement synthétisés (Hogan & Kolodziej, 2002; Lubarsky & Krasnow, 2003) (cf figure 2.5 page suivante).

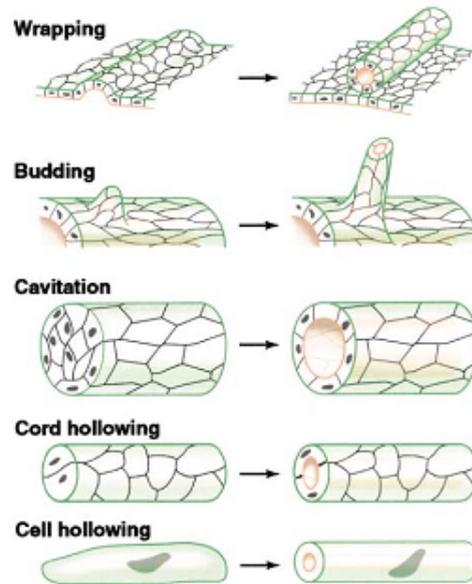


FIGURE 2.4 – Les principaux mécanismes de formation d'un tube

Dans le mécanisme de formation par enroulement à partir d'un épithélium ("Wrapping"), l'épithélium se déforme pour donner naissance au tube qui sera séparé de l'épithélium. Un tube peut se former par bourgeonnement, une excroissance déforme l'épithélium et donne progressivement naissance à un tube par l'organisation des cellules au sein du tube ("Budding"). Un tube peut également se former dans un ensemble de cellules par apoptose des cellules centrales, ce qui conduit à l'obtention d'un tube ("Cavitation"). Enfin un tube peut se former par la réorganisation de cellules qui entraîne l'apparition d'un lumen interne. Ce mécanisme peut fonctionner avec plusieurs cellules ("Cord hollowing") ou au sein d'une seule cellule ("Cell hollowing"). D'après (Lubarsky & Krasnow, 2003).

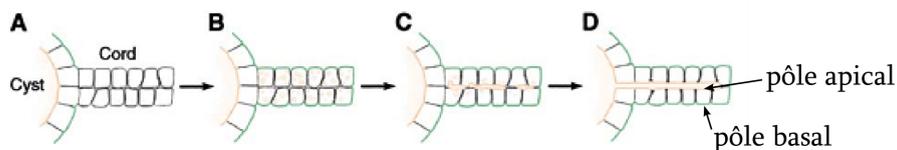


FIGURE 2.5 – Formation d'un lumen connecté à un kyste par une sécrétion polarisée

La formation d'un lumen dans un groupe de cellules non polarisées (A) implique la formation d'une membrane apicale. Dans un premier temps une sécrétion polarisée va permettre la formation d'une membrane apicale, et d'un lumen (B et C). Ce lumen est ensuite raccordé au lumen pré-existant (D). D'après (Lubarsky & Krasnow, 2003)

L'étude de la formation des tubes a en outre révélé que des mécanismes internes sont à l'œuvre pour contrôler la taille du tube. Autrement dit le tube en formation peu en quelque sorte évaluer sa propre taille et stopper son expansion lorsqu'il a atteint une certaine limite. Les gènes *PKD1* et *PKD2* ont été impliqués dans la polycystose rénale, maladie autosomale dominante, caractérisée par une expansion incontrôlée du tube rénal, qui finit par former des kystes séparés du tubule. Ces deux gènes codent pour des protéines formant des canaux calciques, qui s'expriment préférentiellement dans le cil primaire (Yoder *et al.*,

2002). Une tension exercée sur le cil primaire entraîne un afflux calcique, qui déclenche un relargage de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Ce signal se répand aux cellules adjacentes et bloque la croissance du lumen par l'arrêt de la biosynthèse des constituants de la membrane apicale, de la sécrétion et de la prolifération (Lubarsky & Krasnow, 2003). Les protéines PKD1 et PKD2 seraient donc impliquées dans un mécanisme de signalisation calcique visant à contrôler la croissance du tube.

Les étapes de formation d'un tube, indépendamment de son type, peuvent se résumer comme suit. Un signal va spécifier l'orientation de l'axe apico-basal de la cellule ou du groupe de cellules, avec les pôles basaux et apicaux tournés respectivement vers l'extérieur et vers l'intérieur du tube. Des vésicules cytoplasmiques vont alors être adressées à la membrane apicale, y fusionner et augmenter la surface apicale. Des mécanismes dépendants du cil vont alors réguler la taille du tube et empêcher une expansion incontrôlée.

## 2.3 Les voies de signalisation Wnt et Notch : rôle dans la régulation de la prolifération, différenciation et dans l'homéostasie de la crypte

De nombreuses voies de signalisation sont à l'œuvre dans l'épithélium de la muqueuse colique, dont les voies Wnt, TGF-beta, BMP, K-ras, LKB, Notch et Hedgehog. Dans cette partie nous détaillerons plus précisément le rôle des voies Wnt et Notch dans la régulation de processus clés pour l'homéostasie de la crypte.

### 2.3.1 La voie Notch

La voie de signalisation Notch permet à un groupe de cellules de s'engager dans un programme de différenciation cellulaire en faisant jouer un mécanisme d'inhibition de contact avec les cellules voisines. Dans un premier temps toutes les cellules expriment le récepteur Notch (N) transmembranaire à leur surface (cf figure 2.6 page suivante). Les récepteurs Notch sont activés par la liaison de ligands transmembranaires Delta et Serrate. On parle ainsi de cellules émettrices de signal et exprimant à leur surface les protéines *Delta* et *Serrate*, et de cellules receveuses de signal exprimant le récepteur Notch. Suite à la liaison d'un ligand le récepteur Notch va subir deux protéolyses successives générant dans un premier temps une forme active du récepteur encore liée à la membrane, puis lors de la deuxième protéolyse un domaine cytoplasmique appelé **NICD** (Notch Intracellular Domain). La deuxième protéolyse est réalisée par la  $\gamma$ -sécrétase. Ce domaine NICD est adressé dans le noyau où il participe à l'activation de la transcription par liaison à la protéine CSL (CBF1 chez l'humain) possédant un site de liaison à l'ADN (Borgne *et al.*, 2005). Les gènes cibles de la voie Notch peuvent être eux-mêmes impliqués dans la régulation transcriptionnelle d'autres gènes, comme c'est le cas pour les répresseurs

transcriptionnels HES (Hairy/Enhancer of Split). Une des cibles de *Hes-1* est le gène *Math1*, un facteur de transcription impliqué dans la différenciation cellulaire.

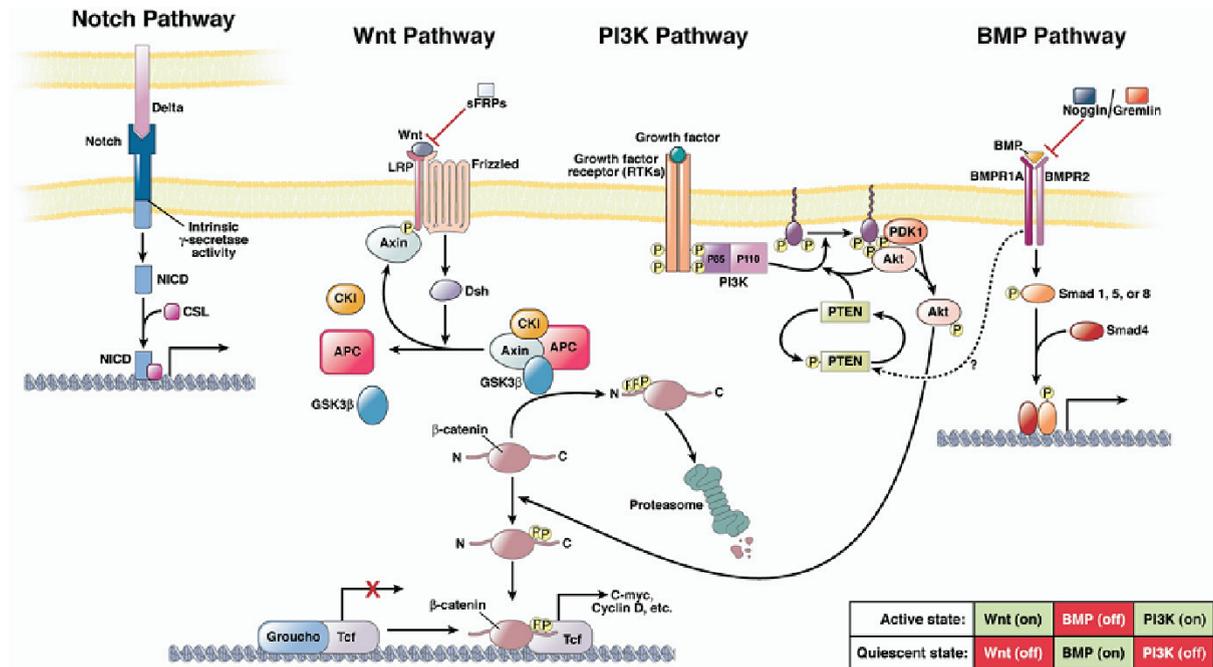


FIGURE 2.6 – Principales voie de signalisation à l'œuvre dans la crypte

Représentation des voies Notch, Wnt, PI3K et BMP. L'activation de ces voies conduit à l'activation de la transcription de gènes cibles. D'après (Scoville *et al.*, 2008)

Le rôle de Notch dans l'épithélium de l'intestin grêle a été montré par des expériences inhibant la voie Notch, soit par délétion conditionnelle des gènes cibles (allèle *Rbp-J* floxé) ou l'utilisation d'inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase (dibenzazepine, DBZ). Dans les deux cas l'inhibition de la voie Notch conduit à des changements drastiques dans le compartiment prolifératif des cryptes de l'intestin grêle (les données sont sensiblement les mêmes pour le côlon). Les cellules transitoires en prolifération rapide sont absentes, et sont redirigées dans un programme de différenciation qui conduit à l'obtention de cryptes peuplées de cellules caliciformes (Es *et al.*, 2005). Cet effet est d'autant plus significatif si l'on considère que la voie Wnt semble toujours active à en juger par la localisation nucléaire de la  $\beta$ -caténine. L'inhibition de la voie Notch a également un effet sur des cellules d'adénomes, et conduit dans  $\approx 50\%$  des cas à une conversion en cellule caliciformes, ouvrant ainsi des perspectives thérapeutiques prometteuses pour les inhibiteurs de  $\gamma$ -sécrétase développés initialement pour traiter la maladie d'Alzheimer. Autrement dit l'inhibition de la voie Notch abroge complètement la prolifération des cellules transitoires<sup>1</sup> et produit un compartiment uniquement peuplé de cellules post-mitotiques et différenciées. Parallèlement l'importance de la voie Notch a été montrée par l'utilisation de souris exprimant

1. il serait intéressant d'analyser les effets sur le compartiment des cellules souches, mais ceci nécessite des observations à plus long terme potentiellement incompatibles avec les effets rapides de l'inhibition de la voie Notch.

une forme constitutivement active du récepteur Notch (N1ic). Ces souris présentent un changement de répartition des types cellulaires le long de l'axe crypte-villus, avec d'une part une déplétion quasi complète des cellules caliciformes et une diminution importante des cellules entero-endocrines et de Paneth (Fre *et al.*, 2005). L'expression de N1ic entraîne donc une inhibition profonde de la différenciation dans la crypte. D'autre part la présence d'une forme active du récepteur entraîne une expansion du compartiment des cellules transitoires ainsi que la présence de cellules en division le long du villi, là où normalement ce compartiment ne contient que des cellules différenciées. La voie Notch agit donc dans la situation normale pour maintenir un compartiment de cellules prolifératives non différenciées.

### 2.3.2 La voie Wnt

La voie Wnt est une voie essentielle dans la régulation de l'homéostasie de la crypte. En effet la voie Wnt participe au maintien des cellules souches et des cellules non différenciées. La voie Wnt est également impliquée dans le contrôle de la position des différents compartiments le long de l'axe crypte-villus. Il existe au moins trois voies de signalisation Wnt, la voie Wnt canonique qui sera décrite ici, la voie Wnt Ca<sup>2+</sup>, et la voie Wnt/PCP.

La voie Wnt canonique regroupe un ensemble de protéines découvertes au cours de recherches aussi variées que l'étude du développement, la formation de tumeurs mammaires après infection virale, ou l'étude de mutants dans les segments au cours du développement chez la drosophile. Le modèle général qui émerge après 25 ans de recherches sur les constituants de la voie Wnt fait apparaître un système de signalisation composé de protéines Wnt sécrétées, de récepteurs membranaires qui vont lier ces protéines Wnt, et d'un système de régulation du taux d'un effecteur cytoplasmique, la  $\beta$ -caténine, qui peut être transloquée dans le noyau et activer la transcription de gènes cibles par sa liaison à des co-facteurs. En l'absence de ligand Wnt sur le récepteur transmembranaire Frizzled la  $\beta$ -caténine est liée par un complexe de destruction contenant la protéine APC et l'Axine, ce qui permet la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine par la caséine kinase 1 $\alpha$  (CK1 $\alpha$ ) et la glycogène synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). La  $\beta$ -caténine est alors adressée vers le protéasome pour être dégradée, par une interaction avec la  $\beta$ -transducin repeat-containing protein ( $\beta$ -TrCP), une protéine du complexe E3-ubiquitin ligase (cf figure 2.7 page suivante, partie A). Ainsi en l'absence de signal Wnt le taux de  $\beta$ -caténine cytoplasmique reste faible et il n'y a pas de transcription des gènes cibles de la voie Wnt. Lors de la liaison de ligand Wnt sur le récepteur Frizzled, les co-récepteurs LRP5-LRP6 sont recrutés et phosphorylés par CK1 $\alpha$  et GSK3 $\beta$ , ce qui entraîne l'adressage de Dishevelled à la membrane plasmique, son interaction avec Frizzled et une polymérisation avec d'autres molécules Dishevelled (Roberts *et al.*, 2007; Schwarz-Romond *et al.*, 2007). Ce polymère ainsi que les co-récepteurs phosphorylés entraînent une relocalisation de l'axine et du complexe de destruction à la membrane plasmique, qui inactive le complexe de destruction. La  $\beta$ -caténine n'est alors

plus dégradée et va être adressée au noyau, où sa liaison aux facteurs de transcription TCF et LEF forme un complexe transcriptionnellement actif (cf figure 2.7, partie B). De nombreux gènes cibles ont été identifiés, incluant des gènes fonctionnant dans la différenciation, l'adhésion, la signalisation, la prolifération, ainsi que des gènes de la voie Wnt elle-même montrant la capacité d'auto-régulation de cette voie.

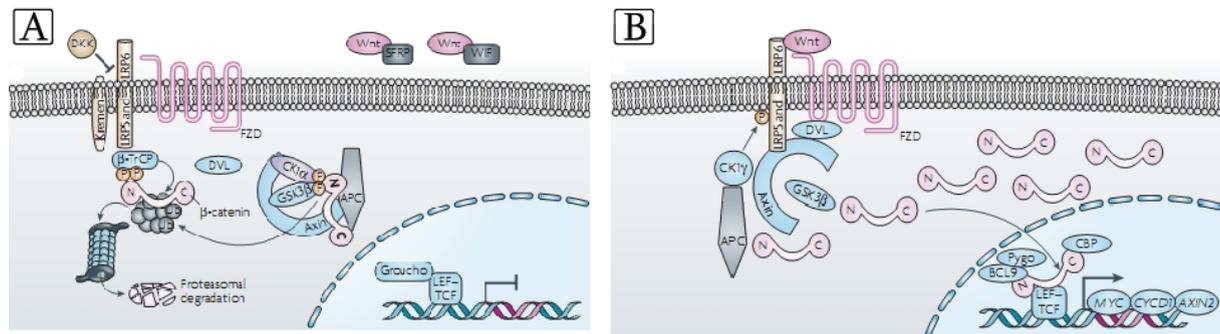


FIGURE 2.7 – La voie Wnt

En l'absence d'un ligand Wnt la  $\beta$ -caténine est phosphorylée au sein d'un complexe comprenant APC, l'Axine, GSK3 $\beta$  et CK1 $\alpha$ . Cette phosphorylation entraîne son adressage vers le protéasome et sa dégradation (A). La liaison d'un ligand Wnt entraîne l'inactivation du complexe de destruction par une relocalisation à la membrane plasmique. La  $\beta$ -caténine n'est plus phosphorylée et peut alors être adressée au noyau, où sa liaison à des facteurs de transcription induit la transcription des gènes de la voie Wnt. D'après (Klaus & Birchmeier, 2008).

### 2.3.3 Rôle de la voie Wnt dans l'épithélium intestinal et le cancer

**Rôle dans l'homéostasie de la crypte** La voie Wnt joue un rôle essentiel dans le contrôle de la prolifération des cellules transitoires de la crypte. La délétion de Tcf4 ou de la  $\beta$ -caténine conduit à une réduction drastique des cellules prolifératives de la crypte (Korinek *et al.*, 1998; Fre *et al.*, 2005; Ireland *et al.*, 2004). Cette délétion conduit même jusqu'à la disparition des cryptes et la mort de l'animal, provoquée par des problèmes intestinaux (Fevr *et al.*, 2007). De même la surexpression d'un inhibiteur de la voie Wnt, Dkk-1, produit une diminution du nombre des cellules prolifératives (Pinto *et al.*, 2003). A l'inverse des mutations dans des régulateurs négatifs de la voie Wnt tel APC ou l'expression d'une forme oncogénique constitutivement active de la  $\beta$ -caténine résultent en une augmentation du compartiment prolifératif (Wong *et al.*, 1998). Le rôle d'APC a été montré par l'utilisation de souris dont la délétion d'APC dans l'intestin peut être activée conditionnellement. Ces modèles ont révélé de profondes perturbations dans l'organisation de la crypte, avec des problèmes de différenciation, de migration, d'expansion du compartiment prolifératif et d'augmentation de la prolifération. L'organisation du tissu est anormale et l'on constate la présence de cellules de Paneth le long de l'axe alors qu'elles résident normalement dans le bas de la crypte (Oshima *et al.*, 1995a; Sansom *et al.*, 2004; Andreu *et al.*, 2005). La voie Wnt joue également un rôle clé dans l'organisation

compartimentale de la crypte via des gènes cibles de la transcription  $\beta$ -caténine/TCF : les récepteurs EphB et ligands Ephrin-B. Ces récepteurs-ligands sont en effet en partie responsables de la migration vers le fond de la crypte des cellules de Paneth, et de l'organisation en compartiments distincts des cellules en prolifération et des cellules différenciées le long de l'axe crypte-villus. La délétion de ces gènes conduit à une migration aberrante des cellules de Paneth et un mélange de cellules prolifératives et de cellules différenciées (Batlle *et al.*, 2002; 2005; Holmberg *et al.*, 2006).

**Rôle dans le cancer** La suspicion d'un lien entre la voie Wnt et le cancer remonte à 1993 quand le groupe de Vogelstein, Kinzler et Polakis découvrent la connexion entre la  $\beta$ -caténine et la protéine APC (Rubinfeld *et al.*, 1993; Su *et al.*, 1993). La protéine APC (cf partie 1.7 page 44) joue un rôle clé dans le cancer colorectal. Il a ainsi été montré qu'une grande partie des cancers colorectaux sporadiques présentent une mutation dans le gène *Apc*, et que les patients atteints de polypose adénomateuse familiale **FAP** sont porteurs d'une mutation dans le gène *Apc* et développent invariablement de nombreux polypes dans le côlon pouvant évoluer en cancer. De plus l'identification de souris développant de nombreux polypes après exposition à l'ENU (*EthylNitrosoUrée*, agent mutagène) a permis de montrer que ces souris étaient porteuses d'une mutation dans le gène *Apc* (Moser *et al.*, 1990; Su *et al.*, 1992). Ces souris dénommées *Min* pour *Multiple Intestinal Neoplasia* ont une mutation non-sens au codon 850 et expriment un fragment tronqué; elles représentent un modèle couramment utilisé dans l'étude de la cancérogenèse intestinale. De par ces propriétés, le gène *Apc* est donc considéré comme un gène suppresseur de tumeurs. Les mutations rencontrées dans les cancers sporadiques apparaissent préférentiellement dans des domaines précis, conduisant à l'expression d'un fragment  $N_{ter}$  tronqué. Une seule mutation dans le gène *Apc* n'est pas suffisante pour déclencher l'apparition de polypes, une deuxième mutation ou 'second hit' est nécessaire, y compris pour les patients **FAP** (Rowan *et al.*, 2000). L'identification du lien entre voie Wnt et cancer du côlon a été suivie par la démonstration que la plupart des autres protéines de cette voie étaient la cible de mutations dans les cancers sporadiques du côlon ou dans d'autres tumeurs. Dans les cancers colorectaux sporadiques on a trouvé des mutations gain de fonction dans le gène *CTNNB1* (gène de la  $\beta$ -caténine) ainsi que dans quelques rares cas des mutations dans les gènes *AXIN1* et *AXIN2*. D'une façon générale ces mutations conduisent à une stabilisation non régulée de la  $\beta$ -caténine qui se traduit par une activation aberrante de la voie Wnt.

### 2.3.4 L'épithélium intestinal : un tissu intégré

Une description de l'épithélium intestinal ne doit pas omettre l'importance du mésenchyme sous-jacent dans la régulation de ce tissu. En effet les interactions entre l'épithélium intestinal et le mésenchyme sont capitales au cours du développement pour la régionalisation.

sation du tissu et le contrôle de l'expression génique suivant les régions (Ratineau *et al.*, 2003). Des expériences de greffes ont montré la capacité du mésoderme transplanté à induire dans l'épithélium au contact un programme de différenciation impliquant la formation de villus (Simon-Assmann & Kedinger, 1993). L'expression des gènes homéotiques tels Cdx1 et Cdx2 semblent ainsi être en partie sous le contrôle de l'interaction de l'épithélium avec le mésenchyme (Duluc *et al.*, 1997). Une étude récente utilisant des puces à ADN pour analyser le programme transcriptionnel du mésenchyme et de l'épithélium séparés a confirmé la complexité des interactions entre ces deux tissus. Chacun de ces tissus présente un programme transcriptionnel particulier. Dans le cas de l'épithélium ce programme est spécifique du tissu, c'est à dire que la majorité des gènes exprimés sont spécifiques au tissu et ne sont pas ou peu exprimés dans d'autres tissus. Dans le cas du mésenchyme le programme est plus ubiquitaire, avec un enrichissement en voie de signalisation jouant un rôle dans d'autres tissus (BMP, Notch, Wnt, Hedgehog) (Li *et al.*, 2007). Cette étude montre donc un modèle où le mésenchyme exprime un ensemble de voie de signalisation, qui vont induire dans l'épithélium intestinal un programme de différenciation et de spécialisation.

## 2.4 Cellules souches : maintien de l'homéostasie et rôle possible dans la cancérogenèse du côlon

### 2.4.1 Caractéristiques et rôle dans l'homéostasie de la crypte

Les cellules souches, au nombre de quatre à six par crypte, assurent le renouvellement de l'épithélium des cryptes. Dans les cryptes du côlon les cellules souches sont localisées au fond de la crypte, à la différence de l'intestin grêle où les cellules souches résideraient entre les cellules de Paneth situées elles en position +4 (la position +1 désignant la première cellule du fond de la crypte) (Barker *et al.*, 2007). Les cellules souches se définissent par plusieurs caractéristiques : elles sont indifférenciées, dans un état de prolifération, sont capables de se renouveler et de donner naissance à l'ensemble des types cellulaires représentés dans la crypte (Booth *et al.*, 1999). Les cellules souches ont été initialement caractérisées par leur capacité à retenir le BrdU. L'étude de l'homéostasie des cryptes par l'utilisation de rayonnements radioactifs sur un modèle murin a montré l'extrême sensibilité aux rayonnements des cellules en position +4, ces cellules sont sélectivement éliminées suite à l'irradiation (Potten, 1977). En recoupant ces données avec la capacité de ces cellules à retenir un marquage au tritium il en a été déduit que ces cellules seraient des cellules souches. Leur sensibilité particulière comparée aux cellules transitoires en division rapide et qui devraient être plus touchées étant censées protéger le compartiment des cellules souches des effets délétères de mutations génétiques. Ces études ont également montré la capacité des cellules directement issues de divisions asymétriques à remplacer

les cellules souches si celles-ci venaient à s'éteindre. On en déduit que le caractère "cellule souche" est probablement une propriété modulable et flexible, constitutive des cellules souches mais également potentiellement activable dans les cellules prolifératives issues des premières divisions asymétriques. Très récemment l'équipe de H. Clevers a montré de façon convaincante en particulier par l'utilisation d'une souris knock-in inductible dans la souche rapporteur Rosa26-LacZ que le marqueur Lgr5 était un marqueur spécifique des cellules souches (Barker *et al.*, 2007). Les expériences de suivi de lignage ont montré que les cellules exprimant Lgr5 génèrent l'ensemble des différents types cellulaires de l'épithélium de la crypte, établissant ainsi leur caractère de cellule souche. L'expression restreinte à un nombre faible de cellules d'un marqueur est souvent avancée comme suffisante pour prouver le caractère cellule souche mais elle ne démontre ni la capacité à renouveler l'épithélium, ni la propriété de résider longtemps dans la crypte. Ainsi les études se fondant uniquement sur ce type d'observation sont de facto moins convaincantes. Citons parmi les divers marqueurs avancés pour les cellules souches EphB2 (Batlle *et al.*, 2002), musashi (Kayahara *et al.*, 2003; Nishimura *et al.*, 2003; Potten *et al.*, 2003) ou encore DCAMKL-1 (May *et al.*, 2007). Il s'avère que ces marqueurs sont plutôt des marqueurs de compartiment (ici la base des cryptes) que de réels marqueurs spécifiques des cellules souches.

**Rôle dans l'homéostasie de la crypte** Les cellules souches peuvent être considérées comme le centre de régulation de l'homéostasie des cryptes. L'homéostasie est un équilibre entre le taux de renouvellement des cellules prolifératives c'est-à-dire la fréquence de production de ces cellules par les divisions des cellules souches et leur élimination par apoptose après qu'elles aient migré vers l'épithélium de surface. Les cellules souches doivent suivre un processus de division asymétrique pour se maintenir. L'homéostasie de la crypte est directement sous le contrôle de la fréquence et du nombre de ces divisions asymétriques. En effet l'équilibre entre les divisions asymétriques des cellules souches produisant une cellule souche et une cellule proliférative, et les divisions symétriques produisant soit deux cellules souches soit deux cellules prolifératives va dicter le renouvellement du tissu. Le nombre de cellules prolifératives est directement sous le contrôle des divisions des cellules souches, et la régulation des divisions des cellules souches est capital dans le maintien d'un nombre stable de cellules au sein de la crypte. Plus précisément le nombre de cellules prolifératives est sous le contrôle de la fréquence des divisions des cellules souches et du taux de divisions asymétriques de celles-ci.

Deux modèles opposés décrivent le mode de formation des tumeurs dans le côlon : le modèle "top-down" et le modèle "bottom-up". D'après le modèle "top-down" les premières lésions ont lieu au niveau de l'épithélium de surface et ces cellules mutées colonisent la crypte en se propageant vers le bas de celle-ci. A l'inverse dans le modèle "bottom-up" l'évènement initial a lieu à la base de la crypte, et consiste en une mutation dans une

cellule souche, qui va induire sa prolifération et la colonisation de la crypte pour former ensuite un adénome monoclonal. Plusieurs arguments plaident en faveur de ce modèle : premièrement selon la séquence adénome-carcinome de Fearon & Vogelstein (Fearon & Vogelstein, 1990) la transformation du tissu sain en un tissu malin passe par une succession de mutations dans des gènes cibles (Apc, p53, k-ras) qui vont conférer un avantage sélectif aux cellules mutées et permettre l'évolution vers un carcinome. En second lieu, plusieurs mutations survenant de manière aléatoire sont nécessaires pour aboutir à la formation d'un adénome. Pour qu'une cellule acquiert l'ensemble de ces mutations elle doit demeurer suffisamment longtemps au sein de la crypte, ce qui est le cas des cellules souches.

### 2.4.2 Dérégulation des divisions asymétriques et cancérogénèse

Des données récentes renforcent l'hypothèse que le cancer du côlon est issu de cellules souches mutées et l'on parle maintenant de *Colon Cancer Initiating Cell (CC-IC)* (Ricci-Vitiani *et al.*, 2008). Ces résultats s'appuient sur la possibilité d'isoler les cellules d'une tumeur portant certains marqueurs de surface (CD133) et d'estimer leur potentiel cancérogène par injection dans une souris nude. Des expériences en dilution limite montrent, en comparaison avec des cellules non enrichies qu'un nombre restreint de cellules est capable d'induire la tumorigénèse. L'interprétation, par modélisation et en comparaison avec des marquages sur des patients FAP conforte l'idée d'une origine dans les cellules souches du cancer du côlon.

Un modèle numérique de la crypte intégrant différents paramètres (prolifération, différenciation, apoptose) rend compte de certaines observations (Boman *et al.*, 2001). Le marquage de ki-67, un marqueur de la prolifération montre chez les patients FAP une augmentation importante du compartiment prolifératif. Les valeurs de paramètre du modèle numérique qui sont compatibles avec cette observation impliquent une perturbation de la fréquence des divisions asymétriques des cellules souches. Dans une situation normale il est estimé que 95% des divisions des cellules souches sont asymétriques. Une dérégulation même légère de la fréquence de ces divisions asymétriques est en mesure d'expliquer cette augmentation importante du compartiment prolifératif (Boman *et al.*, 2004).

L'ensemble de ces données indique que les stratégies futures dans le traitement du cancer du côlon devraient se focaliser sur le ciblage des cellules souches. Une autre donnée importante qui renforce l'hypothèse de "cancer stem cell" comme initiateur de la cancérogénèse provient de l'étude de la dérégulation du processus de fission des cryptes (cf page 76). Il est en effet possible d'établir un parallèle entre le mécanisme normal de fission des cryptes, le rôle potentiel des cellules souches dans l'initiation de ce processus et la dérégulation de ce processus. Nous pouvons poser l'hypothèse qu'une ou l'ensemble des cellules souches jouent un rôle dans l'initiation de la fission, celle-ci se produisant à la base de la crypte, précisément où résident les cellules souches. Dans les conditions normales

la fission commence à la base de la crypte et donne deux cryptes de taille comparable (Wasan *et al.*, 1998). Certaines mutations du gène *Apc* abolissent le caractère symétrique de la fission qui commence alors non pas à la base mais le long de la crypte, et peut se reproduire plusieurs fois dans une même crypte. La formation de cryptes multiples pourrait potentiellement participer à la croissance d'une tumeur. Si l'on assimile la cellule souche à un centre organisateur, on peut penser que les mutations du gène *Apc* qui augmentent le nombre de cellules souches, probablement par dérégulation des divisions asymétriques (Boman *et al.*, 2001; 2004; 2007; Boman & Huang, 2008) induisent une délocalisation des cellules souches à des positions plus élevées que la normale, et provoquent des fissions à des positions aberrantes, ces cellules souches continuant de fonctionner comme centre organisateur.

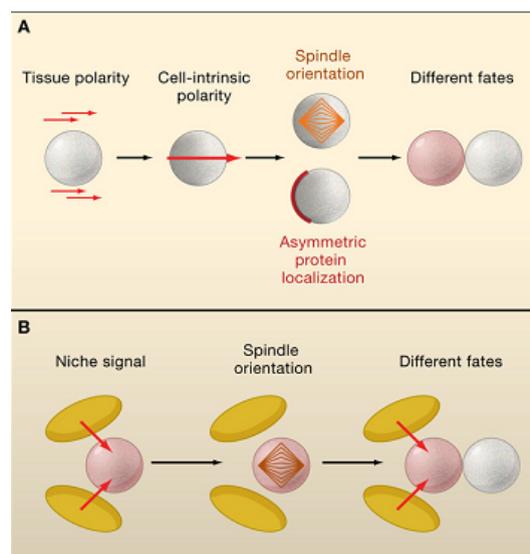


FIGURE 2.8 – Mécanismes permettant le maintien d'une population de cellules souches

Deux mécanismes principaux permettent le maintien d'une population de cellules souches. Dans le cas d'une division asymétrique un axe de polarité imposé par le tissu entraîne la localisation asymétrique de déterminants cellulaires. Le fuseau s'oriente avec cet axe de polarité et provoque une ségrégation asymétrique de protéines au moment de la cytokinèse (A). Dans le cas d'une division symétrique de la cellule souche une des deux cellules filles reste au contact de la niche, et reçoit la signalisation émanant de cette niche qui permet le maintien du caractère cellule souche. La cellule fille plus éloignée n'est plus au contact de cette niche et va donc se différencier (B). D'après (Knoblich, 2008)

### 2.4.3 Théorie du brin immortel ou la ségrégation non aléatoire du brin parental comme un mécanisme de division asymétrique

La division asymétrique semble le mécanisme le plus probable pour expliquer les divisions des cellules de la niche, qui gardent la capacité de régénérer l'ensemble des cellules de la niche. Dans le schéma classique de la division asymétrique, la cellule souche donne

une cellule souche et une cellule appelée à se différencier. Cette division asymétrique reposerait sur la ségrégation asymétrique de déterminants cellulaires. Pour autant rien n'est connu à l'heure actuelle sur la nature de l'asymétrie de ces divisions.

Un mécanisme basé sur un signal émanant d'une niche est à l'œuvre dans certains systèmes tels les cellules souches germinales chez le mâle *Drosophila* (Yamashita *et al.*, 2003). Dans ce système une signalisation va permettre de maintenir le caractère de cellule souche au contact de la niche. La cellule issue de la division ne reçoit plus ce signal et va se différencier (Li & Xie, 2005).

Un autre mécanisme de division asymétrique dont le mécanisme est pour l'instant non compris est la ségrégation non aléatoire du brin parental dans la cellule souche. Cette théorie dite théorie du brin immortel a été formulée dans les années 70 (Cairns, 1975). Celle-ci stipule que dans une cellule souche le brin néosynthétisé au cours de la réplication ségrège de façon asymétrique dans la cellule amplificatrice transitoire alors que le brin parental est conservé dans la cellule souche. Ce mécanisme de ségrégation non aléatoire du brin parental assurerait la stabilité génétique de la cellule souche en évacuant le brin nouvellement synthétisé et donc potentiellement porteur de mutation dans la cellule transitoire. Récemment des données expérimentales ont permis d'étayer cette théorie mais aussi d'en montrer les limites. L'équipe de Potten a montré (Potten *et al.*, 2002) par incorporation de thymidine tritiée ( $^3\text{HTdR}$ ) dans le brin parental puis de bromodeoxyuridine (BrdUrd) dans les brins néosynthétisés une rétention du marquage par les LRCs (Label Retaining Cell) dans la zone censée contenir les cellules souches (cf figure 2.9 page suivante).

La cellule souche doit également faire face aux mutations liées à l'action d'agents mutagènes tels les radiations. Il semble également qu'elles soient capables d'éviter ces mutations puisque les cellules en position +4 et qui sont marquées après incorporation de ( $^3\text{HTdR}$ ) sont extrêmement sensibles aux radiations et meurent par apoptose sous l'action d'une irradiation trop intense. Ainsi la cellule souche se protégerait contre les mutations par ségrégation du brin néosynthétisé et mort par apoptose dans le cas d'actions d'agents mutagènes. Le mécanisme de maintien du brin parental a été mis en évidence dans plusieurs systèmes à ce jour : dans les cellules épithéliales de la glande mammaire (Smith, 2005) et les cellules souches embryonnaires (Armakolas & Klar, 2006). Cette dernière étude montre une variabilité suivant les tissus dans la ségrégation aléatoire ou non du brin parental, certains tissus (mesoderme, cardiomyocyte, cellules du pancréas) adoptant apparemment une ségrégation aléatoire du brin parental. Cette étude a été remise en question du fait de la possibilité d'obtenir le même résultat non pas par ségrégation mais par recombinaison (Haber, 2006). Une étude sur les cellules souches du follicule des cheveux a également montré que le système de ségrégation non aléatoire n'opère pas dans tous les tissus (Waghmare *et al.*, 2008).

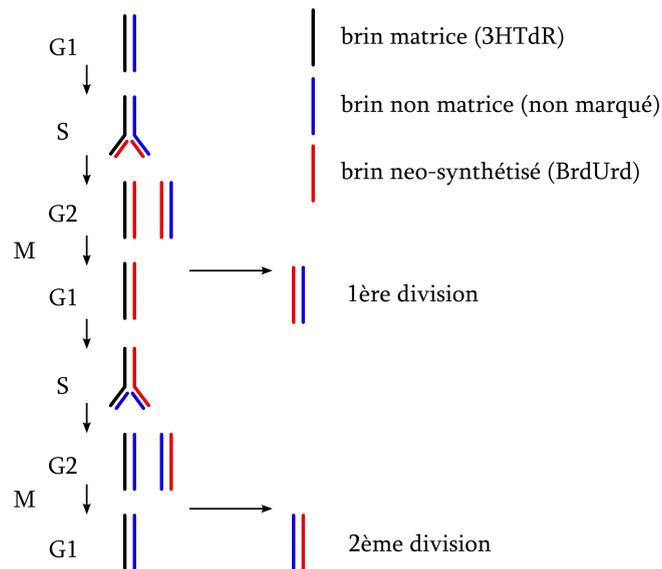


FIGURE 2.9 – Schéma de la théorie du brin immortel

Résumé de l'expérience permettant de révéler la ségrégation asymétrique du brin parental. Le brin nouvellement synthétisé pendant une division est marqué au BrdU. Dans le cas d'une ségrégation asymétrique au cours de la division suivante ce brin marqué sera hérité par la cellule fille. Le marquage dans la cellule souche disparaîtra après deux divisions. D'après (Potten *et al.*, 2002)

## 2.5 Le processus de fission de la crypte

Un processus important de la biologie des cryptes est la fission, qui permet la multiplication du nombre de cryptes par un dé-doublement de cryptes pré-existantes. Le processus commence à la base de la crypte, et consiste en une fission longitudinale et *symétrique* de la crypte qui va progressivement remonter jusqu'à la partie plate de l'épithélium et former ainsi deux cryptes.

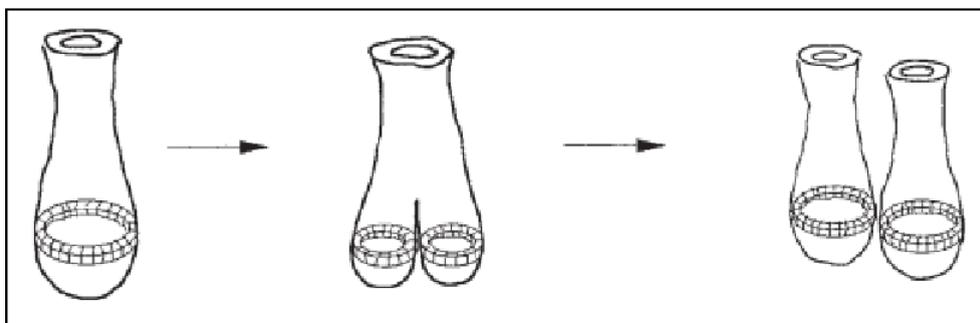


FIGURE 2.10 – Processus de fission symétrique d'une crypte

Lors de la fission d'une crypte un sillon se forme à la base, au niveau des cellules souches. Ce sillon progresse vers l'épithélium plat de surface, et donne ainsi deux cryptes. D'après (Wasan *et al.*, 1998).

Chez la souris ce processus est particulièrement actif dans les premières semaines suivant la naissance et contribue à la formation de l'épithélium intestinal adulte. A l'âge

adulte le processus de fission est toujours observé mais avec une fréquence moindre. Ce processus est également capital pour la régénération du tissu après une lésion. Plusieurs études ont été réalisées pour déterminer le lien entre le processus de fission de la crypte et diverses pathologies. Il a ainsi été montré que dans le cas de patients de la maladie de Crohn ou de colite ulcéreuse le taux de cryptes en fission était normal dans des tissus d'apparence saine mais fortement augmenté dans les tissus touchés par la pathologie (Cheng *et al.*, 1986). Le processus de fission est donc directement relié à des processus pathologiques touchant l'intestin. Une question importante concerne la relation entre les ACF et le processus de fission. Même si le lien entre ACF (cryptes aberrantes) et cancer du côlon existe [cf le chapitre "Cryptes Aberrantes" de la présente page], des questions demeurent non résolues sur l'évolution de ces structures à des stades plus avancés. Le mécanisme de fission est clairement désigné comme pouvant contribuer au développement de structures aberrantes (Roncucci *et al.*, 2000). Ainsi une étude sur la présence de cryptes à plusieurs branches dans des ACF a montré que ces structures pouvaient se développer par le biais de ce mécanisme de fission, dont le caractère symétrique est perturbé parce que l'initiation du processus ne se fait plus uniquement à la base de la crypte mais le long de celle-ci (Fujimitsu *et al.*, 1996). Cette localisation anormale du point de départ de la fission pourrait s'expliquer par la localisation, en position haute de la crypte, d'une sous population de cellules souches suite à une perturbation du nombre de cellules souches. Des dérégulations de polarité impliquées dans le déclenchement du processus de fission sont également à envisager. Toutes ces observations soulignent l'importance des processus qui régulent la fission des cryptes et leur implication potentielle dans les événements précoces conduisant au développement de polypes.

La protéine APC joue un rôle dans le processus de fission car une étude sur des patients FAP et des souris Min a montré une augmentation de la proportion de cryptes en fission et de fission asymétriques de cryptes (Wasan *et al.*, 1998).

## 2.6 Les cryptes aberrantes.

### 2.6.1 Types et Caractéristiques

Les cryptes aberrantes ou ACF (*Aberrant Crypt Foci*) sont des structures dérivant de cryptes saines et présentant des caractéristiques morphologiques et histologiques qui leur sont propres : les cryptes sont allongées, possèdent un espace pericryptal plus important et un lumen irrégulier, et présentent dans certain cas un surélévation de leur orifice (Pretlow & Bird, 2001). Ces cryptes sont généralement identifiables sur des tissus non inclus en paraffine à l'aide d'une loupe binoculaire en lumière transmise par leur marquage plus dense après coloration au bleu de méthylène.

Un des problèmes majeurs dans l'étude de la cancérogenèse du côlon est l'identification des premières structures anormales à l'origine des polypes et il est couramment admis

que les ACF sont les premières structures tissulaires identifiables que l'on peut relier au processus de cancérogenèse. L'intérêt des ACF est leur utilisation comme indicateur à court terme des propriétés anti-cancéreuses ou au contraire cancérigènes de substances pharmacologiques ou présentes dans l'environnement. Il existe cependant des interrogations sur la nature du lien qui existe entre le type d'ACF et la participation au processus de cancérogenèse (Papanikolaou *et al.*, 2000). En effet le lien direct entre les ACF et la formation de polypes n'a pu être prouvé, comme l'ont montré des analyses effectuées à différents temps après administration d'Azoxymethane (AOM, voir plus loin), une substance cancérigène induisant la formation de tumeurs dans l'intestin. Ces expériences ont montré une différence entre le nombre d'ACF et celui des tumeurs, ce qui implique une disparition ou une réversion du phénotype de certaines ACF (McLellan *et al.*, 1991). La seule façon pour trancher définitivement cette question serait de suivre au cours du temps l'évolution des ACF. L'enjeu des études sur les ACF est donc de comprendre le rôle de ces structures et le développement d'adénomes. Un argument supplémentaire pour appuyer l'hypothèse d'un lien entre ACF et développement de polypes vient de l'observation d'une présence accrue de ces structures chez les patients FAP (Roncucci *et al.*, 2000). Ces patients développant spontanément des polypes, l'observation d'une augmentation de la fréquence d'apparition de ces structures suggère un rôle de celles-ci dans le développement de polypes.

Plusieurs types d'ACF ayant été décrites, ce paragraphe détaillera les caractéristiques des ACF 'classiques', des ACF 'plates' ou 'ACF<sub>Min</sub>', et des ACF 'BCAC' (beta-catenin-accumulated crypts).

### ACF non dysplasiques

Ces ACF présentent un caractère hyperplasique identifiable par l'augmentation du nombre de cellules par cryptes, provoquant une altération de leur morphologie. Ces ACF ne présentent pas de caractère dysplasique, c'est à dire de modification néoplasique caractéristique des adénomes.

**ACF classiques** Les ACF ont été initialement décrites dans un modèle de cancérogenèse induite à l'AOM (Bird, 1987). L'équipe de Pretlow a ensuite identifié ces structures chez des patients atteints de cancers colorectaux (Pretlow *et al.*, 1991), permettant par la même de valider ce modèle d'induction à l'AOM comme un modèle pertinent par rapport au processus de cancérogenèse humain. Les ACF de type classiques se caractérisent par une augmentation du diamètre des cryptes, un lumen irrégulier, une hyperplasie et une coloration plus dense que les cryptes normales environnantes après coloration au bleu de méthylène. De plus ces ACF sont légèrement surélevées par rapport à la surface de l'épithélium. Ces ACF ne présentent pas de dysplasie, c'est à dire une perturbation de la morphologie et/ou de l'arrangement des noyaux des cellules épithéliales. Ces struc-

tures contiennent de une à parfois une centaine d'ouvertures de cryptes. Ces cryptes sont généralement de type hyperplasique ou hétéroplasique selon Nucci (Nucci *et al.*, 1997) et ne sont pas considérées comme un indicateur fidèle du processus de cancérogenèse (Hirose *et al.*, 2003). L'argument que l'on peut invoquer pour minimiser le rôle des cryptes non dysplasiques dans le processus de cancérogenèse provient de l'observation chez les patients **FAP** d'une majorité d'ACF dysplasiques (Takayama *et al.*, 2001). Les patients **FAP**, porteurs d'une mutation héréditaire dans le gène *Apc* qui provoque l'expression d'une forme tronquée de la protéine, développent en effet de nombreux polypes qui évoluent en carcinomes en l'absence de traitement. L'évolution suivant la séquence adénome-adenocarcinome dans un contexte génétique caractérisé et défini fait de ces patients une référence dans l'étude de la cancérogenèse colorectale et démontre que ce sont les cryptes aberrantes de type dysplasique qui sont une étape importante du processus de cancérogenèse. Les figures 2.11 et 2.12 montrent les différences fondamentales entre cryptes aberrantes hyperplasiques et dysplasiques.

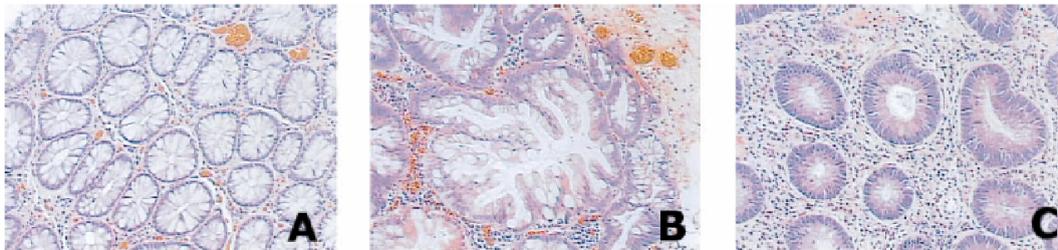


FIGURE 2.11 – Cryptes aberrantes de type hyperplasique et dysplasique

A : cryptes saines, B : cryptes hyperplasiques, C : cryptes aberrantes dysplasiques. D'après (Kinzler & Vogelstein, 1996)

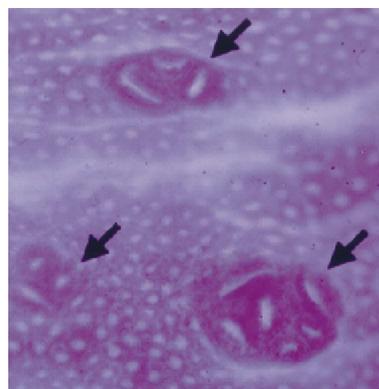


FIGURE 2.12 – Cryptes aberrantes de type 'classiques'

Les flèches indiquent les cryptes aberrantes. Ces cryptes sont légèrement surélevées par rapport à l'épithélium. L'ouverture est aplatie et plus importante que les cryptes environnantes. D'après (Yamada & Mori, 2003)

### ACF néoplasiques

Les cryptes aberrantes néoplasiques sont de façon caractéristique dysplasique, c'est à dire présentant une perturbation du ratio cytoplasme/noyau, et de l'organisation en monocouche des noyaux en rapport avec la musculaire-muqueuse. L'équipe de Mori propose de distinguer en plus une sous-catégorie, les **BCAC**. Leurs arguments, basé principalement sur l'accumulation nucléaire de  $\beta$ -caténine et une perte de localisation basale des noyaux liée à une dysplasie (Yamada *et al.*, 2001) ne permettent pas de définir clairement les caractéristiques précises des BCAC par rapport aux cryptes dysplasiques déjà décrites. Ces cryptes, traitées dans un paragraphe à part, peuvent être considérées d'une façon générale comme des cryptes dysplasiques (Pretlow & Bird, 2001).

**ACF dysplasiques** Les ACF de type dysplasiques ont été décrites pour la première fois chez la souris traitée à l'AOM (Ponder & Wilkinson, 1986) et étudiées plus récemment par l'équipe de Paulsen (Paulsen *et al.*, 2001; 2006). Ces ACF se distinguent des ACF classiques par leurs surfaces plates, c'est-à-dire non surélevée par rapport à l'épithélium, et ne peuvent être identifiées que par marquage au bleu de méthylène et par observation par transillumination. Ces ACF présentent en plus une morphologie d'ouverture de crypte singulière, aplatie au lieu de l'ouverture ronde caractéristique des cryptes saines, comme on peut le voir sur la figure 2.13. Ces cryptes ont perdu la différenciation en cellules caliciformes (Paulsen *et al.*, 2001).

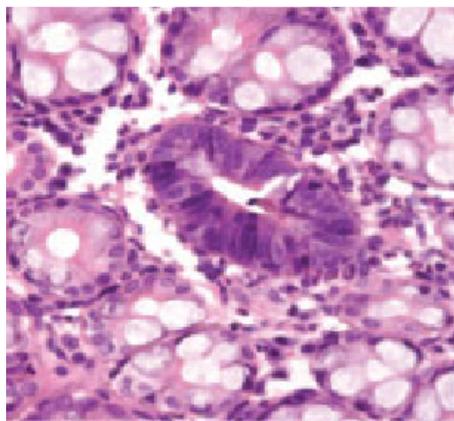


FIGURE 2.13 – Cryptes aberrantes de type 'Dysplasiques'

Ces cryptes présentent un problème d'organisation des noyaux en monocouche, de même qu'un ratio entre le noyau et le cytoplasme perturbé. Marquage à l'hématoxyline-éosine. Grossissement : 400x. D'après (Paulsen *et al.*, 2006)

Ces cryptes présentent une accumulation cytoplasmique de  $\beta$ -caténine, accumulation semblable à celle trouvée dans les polypes. Le caractère dysplasique de ces cryptes ainsi que l'accumulation cytoplasmique de  $\beta$ -caténine étant très similaire à la situation rencontrée dans un polype, les ACF de type 'dysplasiques' sont considérées comme des lésions préneoplasiques, c'est à dire comme réellement précurseurs de polypes.

**Les ACF de type BCAC** Ces ACF ont pour principale caractéristique une accumulation cytoplasmique de  $\beta$ -caténine, comme on peut le voir sur la figure 2.14. Ces cryptes sont décrites chez le rat et la souris Min (Yamada & Mori, 2003). Il est difficile de séparer précisément les ACF ‘dysplasiques’ des ‘BCAC’ (Pretlow & Bird, 2001), en effet la majorité des ‘BCAC’ semblent ‘dysplasiques’.

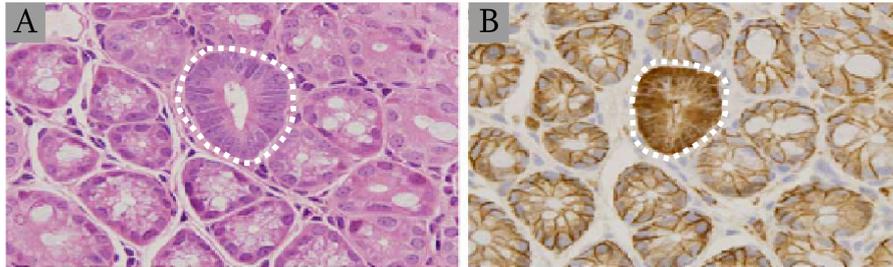


FIGURE 2.14 – Cryptes aberrantes de type ‘BCAC’

Ces ACF ne seraient pas détectables par observation en lumière transmise suite à une coloration au bleu de méthylène, mais uniquement par l’observation de marquage immunocytochimique montrant une accumulation nucléaire de  $\beta$ -caténine (B). Marquage à l’hématoxyline-éosine (A). L’ACF est délimitée par les pointillés blancs. Grossissement : 100x. D’après (Hata *et al.*, 2006)

Ces ACF présentent en plus un degré de dysplasie important, plus poussé que dans les ACF classiques, mais semblable à celui des ‘dysplasiques’.

Il n’est pas possible à l’heure actuelle de conclure de manière définitive sur le lien causal existant entre crypte aberrante et formation de polypes. Les observations histologiques s’accordent cependant avec l’hypothèse que les cryptes aberrantes de type ‘dysplasique’ sont plus à même d’évoluer en polypes que les ACF de type ‘classiques’. Notons qu’il existe probablement une corrélation entre le statut du gène *Apc*, le type de crypte aberrante et le processus de fission des cryptes. En effet il a été montré d’une part que le processus de fission de la crypte peut être perturbé en présence de mutations dans le gène *Apc* (Wasan *et al.*, 1998), et d’autre part que le mécanisme de fission de la crypte serait impliqué dans l’expansion de micro-adénome (Preston *et al.*, 2003). Ces données sont résumées dans le schéma 2.15 page suivante avec un exemple de fission asymétrique de crypte.

## 2.7 Caractéristiques des modèles murins porteurs d’une mutation dans le gène APC.

Les paragraphes qui suivent résument les données sur le type de protéine APC produite et le type d’ACF rencontrées dans les différents modèles murins porteurs d’une mutation du gène *Apc*. Les fragments produits sont toujours des fragments  $N_{Ter}$ . Ce paragraphe détaillera plus précisément les modèles Min850, 1638N et  $\Delta 14$ .

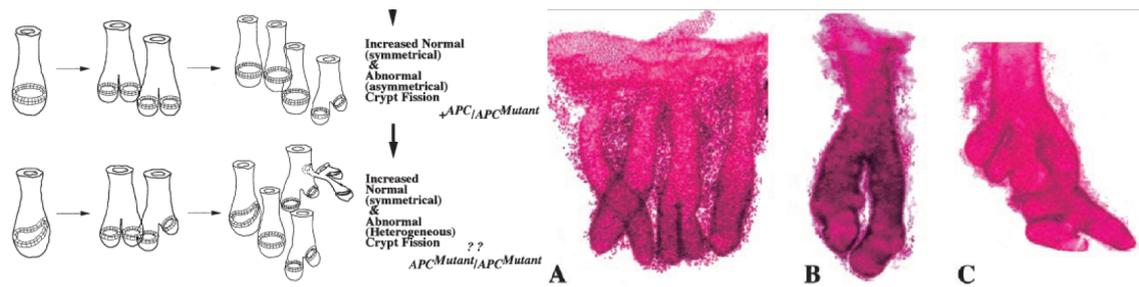


FIGURE 2.15 – Fission asymétrique de cryptes et statut du gène *Apc*

Une mutation dans le gène *Apc* provoque un mécanisme de fission asymétrique des cryptes. La crypte ne se divise plus à partir de sa base mais sur le côté. Ceci conduit à l'obtention de structures aberrantes (C). D'après (Wasan *et al.*, 1998; Preston *et al.*, 2003)

### 2.7.1 Modèles animaux de mutations dans *Apc*

De nombreux modèles murins et un modèle de rat ont été créés, soit par mutagenèse aléatoire et sélection, soit par clonage dirigé. Le résultat général de ces mutations génomiques est l'obtention d'une souris portant une mutation hétérozygote dans le gène *Apc*, situation censée reproduire la situation génétique des patients **FAP**, qui portent une mutation dans le gène *Apc* et développent de nombreux polypes. Les premiers modèles murins datent des années 90, et certains ont été produits plus récemment, puisque le modèle  $\Delta 14$  a été décrit en 2004 (Colnot *et al.*, 2004) et le rat *PIRC* en 2007 (Amos-Landgraf *et al.*, 2007). L'intérêt de ces modèles murins est de reproduire la situation généralement rencontrée chez l'Homme, à savoir la coexpression d'une protéine complète et d'un fragment  $N_{Ter}$ . L'homodimérisation de la protéine APC grâce à ses 58 premiers a.a a été décrite dans les années 90, et il a été alors suggéré que les fragments tronqués avaient un rôle de dominant négatif. Malgré des données issues de modèles murins et cellulaires visant à éclaircir cette question du dominant-négatif, il est difficile de conclure de manière définitive, les conclusions des études *in vivo* et dans des cellules en culture étant contradictoires (Oshima *et al.*, 1995b; Green *et al.*, 2005). Le but de ce chapitre est de donner un aperçu de certains modèles créés, de leurs caractéristiques, et de leurs intérêts pour notre étude.

#### Le modèle Min(850)

Ce modèle a été généré par mutation aléatoire par un traitement des souris à l'ENU (alkylating agent N-ethyl N-nitrosourea). Ce modèle a été nommé MIN pour *Multiple Intestinal Neoplasia* suite à l'observation de la présence de nombreuses tumeurs le long du tractus intestinal (Moser *et al.*, 1990). Le gène muté a ensuite été identifié comme le gène *Apc* (Su *et al.*, 1992). La mutation conduit à l'expression d'un fragment tronqué de 850 a.a. Le fragment  $N_{Ter}$  exprimé est stable et ce modèle ne doit donc par conséquent pas être considéré comme un modèle d'haplo-insuffisance. Les souris homozygotes pour la mutation

*Apc* ne sont pas viables. Les souris Min développent de nombreux polypes, environ une centaine par individu, mais majoritairement dans l'intestin grêle. Des microlésions sont détectables dans le côlon mais celles-ci ne dépassent jamais une certaine taille et évoluent très rarement en tumeurs (Yamada *et al.*, 2002). La localisation inattendue de ces polypes est la critique majeure adressée à ces modèles murins, car chez l'Homme l'apparition de polypes a lieu préférentiellement dans le côlon (Fodde *et al.*, 1999). Plus récemment une étude a réhabilité le modèle de souris Min comme un bon modèle pour l'étude des FAP par la présence de tumeurs dans le duodénum des patients FAP (Preston *et al.*, 2007).

### Les modèles 1638N et 1638T

Ce modèle et le modèle 1638T ont été créés par l'insertion d'une cassette de sélection à la néomycine dans le codon 1638 (Fodde *et al.*, 1994) pour le modèle 1638N et à l'hygromycine pour le modèle 1638T (Smits *et al.*, 1999). Dans le modèle 1638N la cassette est inversée par rapport au sens de transcription du gène *Apc*, alors qu'elle est dans le sens de transcription dans le modèle 1638T (Smits *et al.*, 1999). La différence principale qui en résulte est que le modèle 1638T produit effectivement un fragment tronqué en quantité comparable à l'allèle normal, alors que le modèle 1638N produit une quantité quasi négligeable du fragment tronqué, de l'ordre de 3% par rapport au taux de la protéine APC endogène (Fodde *et al.*, 1994; Smits *et al.*, 1998). Ce modèle doit par conséquent être considéré comme un modèle d'allèle faible ('leaky' en anglais). On peut par extension considérer le modèle 1638N comme un modèle d'haplo-insuffisance. Les souris hétérozygotes pour l'allèle 1638N développent très peu de tumeurs, 5 à 6 avec une localisation préférentielle dans l'intestin grêle (Fodde *et al.*, 1994). Les souris homozygotes pour l'allèle 1638N ne sont pas viables. De façon surprenante les souris hétérozygotes pour l'allèle 1638T ne développent aucune tumeur, et les souris homozygotes sont viables (Smits *et al.*, 1999). Riccardo Fodde considère le modèle 1638N comme un très bon modèle d'AAPC (*Atenuated Adenomatous Polyposis Coli*), phénotype rencontré chez certains patients atteints de mutation en 5' du gène *Apc*.

### Le modèle $\Delta 14$

Le modèle de souris *Apc* +/ $\Delta 14$  a été créé récemment (2004) par l'équipe de Christine Perret (Colnot *et al.*, 2004). La souris a été obtenue par insertion d'une cassette dans l'exon 14, conduisant à l'expression d'un fragment tronqué très court de 580 a.a. Ce modèle est censé développer plus de tumeurs dans le côlon, à l'inverse du modèle Min. Un point intéressant dans cette étude révèle l'importance de l'environnement dans le processus de tumorigénèse. Après obtention de souches stables pour la mutation dans le gène *Apc*, les auteurs ont élevé ces souris dans deux environnements différents, pour tester l'influence de paramètres extra-génétiques sur le nombre et le développement de tumeurs. Cette étude soulève un problème récurrent en cancérogenèse, les facteurs extra-génétiques

(environnementaux), qui jouent un rôle important dans le processus de cancérogenèse. La conséquence est une variation phénotypique importante pour une même souche de souris en fonction par exemple des conditions d'hébergement des souris, qui peut compliquer l'interprétation des résultats.

### Le rat PIRC

Le rat PIRC pour *Polyposis In the Rat Colon* a été obtenu par sélection d'ADN génomique muté par l'ENU dans le gène *Apc* et entraînant une troncature (Amos-Landgraf *et al.*, 2007). Cette mutation entraîne l'expression d'un fragment de 1137 acides aminés, troncature qui tombe dans les répétitions de 15 acides aminés, et qui provoque la perte des domaines SAMP, du domaine de liaison aux microtubules, à EB1 et le domaine PDZ. Les rats développent des tumeurs dans le côlon, dont l'histologie est très proche des tumeurs humaines et inclus une dysplasie, une augmentation du volume nucléaire, et une expansion des cryptes accompagnée d'une perturbation de leur architecture. L'étude génomique des tumeurs montre une perte de l'hétérozygoté (LOH) par délétion de l'allèle sauvage dans la majorité des cas, mais certaines tumeurs conservent l'hétérozygoté, indiquant que la formation de tumeurs ne passe pas forcément par une LOH. Une autre caractéristique de ces modèles est une inégalité des genres face au développement de tumeurs. En effet les mâles développent significativement plus de tumeurs que les femelles (14 contre 7 respectivement) (Amos-Landgraf *et al.*, 2007).

### Un modèle particulier : l'induction de la tumorigénèse par traitement au DSS

Il a été récemment montré une induction forte de la tumorigénèse après traitement au *Dextran Sulfate Sodium*. Ce détergent est habituellement utilisé chez la souris pour induire une colite importante. L'équipe de Tanaka a récemment montré que le traitement de souris Min par DSS induit une forte augmentation du nombre de tumeurs chez ces souris (Tanaka *et al.*, 2006). L'intérêt de ce modèle réside dans l'induction d'un processus de cancérogenèse indépendant d'une induction par mutagenèse, autrement dit il est possible d'obtenir un plus grand nombre de structures analysables sans changer les caractéristiques génétiques du modèle, comme c'est le cas lors de la tumorigénèse induite par l'AOM. Ce modèle représente donc une solution de choix lors d'étude portant sur une mutation précise et nécessitant une quantité de matériel importante.

## 2.7.2 Types d'ACF produites dans les différents modèles

### Modèle Min

Ces souris produisent dans le côlon un nombre restreint d'ACF de type 'dysplasiques', nommées ACF<sub>Min</sub> par Paulsen au vu de leurs particularités (cf 'ACF Dysplasiques', page 80). Ces souris développent peu de tumeurs dans le côlon, malgré la présence

d'environ une vingtaine de lésions dysplasiques (Yamada *et al.*, 2002). Le nombre d'ACF est augmenté après un traitement à l'AOM. Ce traitement augmente le nombre d'ACF "classique" et d'ACF<sub>Min</sub>, avec une variation dans le nombre de ces ACF suivant que les souris sont analysées sept ou onze semaines après l'injection d'AOM. La relation entre le nombre d'ACF<sub>Min</sub> et de tumeurs au cours du temps est inverse. En effet à sept semaines les souris traitées à l'AOM présentent un grand nombre d'ACF<sub>Min</sub> et peu de tumeurs, mais la situation est inversée à onze semaines avec une diminution des ACF<sub>Min</sub> et une augmentation des tumeurs. Le nombre d'ACF "classique" est inchangé. Ceci suggère une évolution des ACF<sub>Min</sub> en tumeurs. Ce qui corrobore bien le modèle selon lequel les ACF de type 'dysplasiques' sont plus pertinentes par rapport au processus de cancérogenèse (Paulsen *et al.*, 2001).

### Modèle 1638N

Les souris 1638N développent un nombre restreint de tumeurs dans l'intestin grêle (5~6), mais ce nombre n'est pas pour autant négligeable. Ce modèle développe des ACF de type classique dans le côlon, c'est-à-dire non dysplasiques. Ce modèle d'haplo-insuffisance qui ne reproduit pas fidèlement la situation d'hétérozygotie des patients FAP est néanmoins intéressant au vu de la présence de ces ACF, car l'allèle *Apc* entier est exprimé dans ces structures, indiquant que ces structures peuvent se développer avant la perte de l'allèle sauvage par LOH (Loss of Heterozygosity). Il faut noter que l'analyse de la présence de l'allèle sauvage est basé uniquement sur un marquage immunohistochimique, il serait important de confirmer ce résultat par une étude génétique. L'inconvénient de ce modèle reste le nombre restreint de ces structures. R. Fodde estime que ce modèle est intéressant pour l'étude du syndrome *AAPC* (Fodde *et al.*, 1999). Compte tenu du faible nombre de structures en l'absence de traitement, ce modèle n'est pas en soi un modèle de choix pour l'étude des ACF. Les souris 1638N développent des ACF de type 'classique' (Pretlow *et al.*, 2003), ce modèle n'est donc pas adapté à l'étude des ACF de type 'dysplasique'. De plus les animaux étudiés ne développent jamais de tumeurs dans le côlon malgré la présence d'ACF avec un nombre très important de cryptes (Pretlow *et al.*, 2003).

Les modèles Delta14 et du rat PIRC étant très récents, aucune donnée n'est disponible sur le nombre et le type d'ACF présentes dans ces modèles.

## 2.8 Loss Of Heterozygosity

La perte d'hétérozygotie signifie la perte d'un des deux allèles parentaux dans une cellule. Cette perte peut provenir d'une délétion, d'une conversion de gène, d'une recombinaison mitotique ou d'une perte chromosomique. La perte d'hétérozygotie ou **LOH** (**L**oss **O**f **H**eterozygosity) survient tôt dans le processus de cancérogenèse du côlon. Sui-

avant la séquence classique adénome-adénocarcinome la LOH surviendrait peut-être même avant une mutation dans le gène *Apc* (Luo *et al.*, 2006). Le schéma classique suggère une mutation de type troncature dans le gène, avant une deuxième mutation de type LOH (Tighe *et al.*, 2004). Il semble difficile d'établir un lien direct entre LOH et ACF dysplasiques (Luo *et al.*, 2006; Amos-Landgraf *et al.*, 2007), puisqu'il est possible de trouver des ACF avec LOH mais sans caractère dysplasique, cependant il semble assez clair que les adénomes présentent tous une LOH pour l'*Apc* (Colnot *et al.*, 2004; Oshima *et al.*, 1995b; 1997). Pourtant ce paradigme n'est peut être pas sans faille car des tumeurs sans LOH ont été décrites chez le rat (Amos-Landgraf *et al.*, 2007), c'est-à-dire avec **MOH** (*Maintenance Of Heterozygosity*). Il faut noter, pour ce genre d'étude, l'intérêt du rat chez lequel les chromosomes métacentriques et non pas acrocentriques comme chez la souris permettent de distinguer entre une LOH par perte du chromosome ou par perte suivi d'une reduplication du chromosome restant. L'étude de ce phénomène sur le rat PIRC a permis de montrer que la majorité des LOH impliquait une perte de l'allèle par recombinaison somatique ou délétion étendue (Amos-Landgraf *et al.*, 2007). De plus l'étude de lésions dysplasiques dans le côlon chez la souris Min a montré la perte d'*Apc* sauvage par LOH, mais ces souris ne développent pas pour autant un nombre élevé de tumeurs dans le côlon. Cette donnée confirme le fait que la LOH semble un prérequis au développement de lésions dysplasiques mais n'est probablement pas suffisante en soi pour déclencher le processus de cancérogenèse (Yamada *et al.*, 2002).

L'étude de marqueurs microsatellites d'ACF de patients montre que la LOH n'est pas un pré-requis au développement d'ACF, de même que la présence de LOH dans ces ACF n'est pas directement corrélée à l'histopathologie de ces ACF, autrement dit il est possible de trouver des ACF avec LOH sans caractère dysplasique. Il existe apparemment une relation entre le statut du gène *Apc* et le caractère dysplasique des ACF. En effet les ACF dysplasiques présentent de façon majoritaire une mutation dans le gène *Apc*, même si les mutations dans *Apc* représentent seulement 5% (Luo *et al.*, 2006). D'après l'ensemble de ces données on peut proposer un schéma selon lequel des mutations aléatoires provoquent l'apparition d'ACF. Ces mutations ne touchent pas que le gène *Apc*, et entraînent donc l'apparition d'ACF au potentiel tumorigénique varié. Dans certains cas cette mutation va entraîner l'apparition d'ACF dysplasiques, très certainement par une mutation dans le gène *Apc*. Le phénomène de LOH s'insère dans ce schéma probablement en amont ou au même niveau que la mutation dans le gène *Apc*.

# Objectifs

## Détermination de l'orientation du fuseau dans un contexte sain et muté pour Apc

La partie introductive a permis de souligner l'importance de la régulation de la morphogenèse dans l'homéostasie de la crypte. Le maintien de la forme caractéristique de la crypte malgré une prolifération intense couplée à une migration implique nécessairement le contrôle du positionnement des cellules, via la migration et/ou un processus de division orientée. Plusieurs arguments plaident en faveur d'un rôle des divisions orientées dans la morphogenèse de la crypte. D'une part ce mécanisme a été montré responsable de la régulation de la taille du tube rénal, et ce via la voie Wnt/PCP. Une perturbation de cette voie conduit à la formation de kystes, par une perturbation des divisions orientées selon l'axe long du tube. Parallèlement des études ont montré l'implication de cette voie Wnt/PCP dans la régulation des divisions orientées dans le développement de la drosophile, qui contribuent à la forme des organes adultes. Autrement dit la morphogenèse peut être en partie régulée par un processus de divisions orientées selon un axe. D'autre part la voie Wnt canonique joue un rôle majeur dans la crypte, et il est dès lors possible d'envisager que la voie non canonique soit également fonctionnelle dans ce tissu.

Nous souhaitons mieux comprendre la situation pour l'orientation des mitoses par rapport à l'axe long de la crypte. En particulier nous voulons adresser la question : existe-t'il un axe d'orientation préférentiel dans la crypte ? La mesure de l'angle entre le fuseau d'une cellule mitotique et l'axe long de la crypte implique la nécessité de réaliser des mesures sur des cryptes entières. Notre objectif était donc de pouvoir isoler, immunomarquer et réaliser des acquisitions de cryptes entières afin d'effectuer des mesures précises d'orientation. Notre deuxième question concerne le rôle d'APC dans ce processus. En effet la partie introductive a permis de montrer l'importance d'APC dans les étapes précoces de la cancérogenèse colique, ainsi qu'une fonction probable dans la régulation de la polarité et/ou de l'orientation du fuseau. Nous nous sommes donc intéressé à la situation dans les cryptes saines de modèles murins porteurs d'une mutation dans le gène Apc. La question est ici de savoir si une mutation dans le gène Apc interfère avec l'orientation suivant l'axe long de la crypte.

Parallèlement à cette étude nous avons étudié l'implication potentielle d'APC dans la polarité apico-basale. Des études chez la Drosophile montrent en effet un rôle d'APC localisée aux jonctions adhérentes dans l'ancrage du fuseau et ainsi dans la division (Lu *et al.*, 2001; McCartney *et al.*, 2001). Notre but ici est de mieux décrire l'effet d'APC sur la polarité apico-basale, et d'étudier les possibles répercussions sur la division. Pour ce faire nous avons utilisé un modèle cellulaire gain de fonction pour APC, composé des lignées SW480 exprimant la protéine APC tronquée, et SW480-APC, qui exprime en plus la protéine APC entière. J'ai développé un programme d'analyse du comportement

du fuseau, afin de comparer le comportement du fuseau pour une population de cellules mitotiques entre ces deux lignées. Enfin nous nous sommes intéressé à la connexion entre la voie Dynéine/Dynactine et la voie  $G_{\alpha i}$ /LGN/NuMA au cortex. Pour ce faire nous avons étudié la localisation corticale des protéines NuMA et CLIP, et mesuré le degré de co-organisation de ces protéines pour les deux lignées.

## Rôle d'APC dans le contrôle de l'orientation du fuseau mitotique

Nous avons étudié l'orientation et l'alignement planaire de fuseaux mitotiques dans un contexte sauvage et muté pour Apc. Nous avons également regardé ces paramètres dans des souris Apc  $-/-$  et dans des ACF de souris Delta14. Ce travail a nécessité la mise au point d'un protocole d'isolation, et de marquage de cryptes entières, afin de réaliser des acquisitions par microscopie confocale rapide. Les mesures ont ensuite été effectuées sous le logiciel Imaris. Nous avons montré qu'il existe une orientation préférentielle avec l'axe long de la crypte, et que les fuseaux s'alignent avec le pôle apical. En absence totale d'APC ces deux paramètres sont affectés, alors que dans la situation des ACF Delta14 seule l'orientation est perturbée. Les modèles murins porteurs d'une mutation dans le gène Apc utilisés dans cette étude (Delta14, 1638N et Min) ne présentent aucun phénotype pour ce paramètre, ce qui suggère qu'une deuxième mutation entraînant une perte d'hétérozygotie (le mécanisme probablement responsable de la formation d'ACF dans les Delta14) est nécessaire pour perturber l'orientation.

L'effet de l'expression d'APC entière dans un contexte Apc tronqué a été étudié dans le modèle SW480. Nous avons confirmé le renforcement des jonctions adhérentes, et montré un renforcement des jonctions serrées. Pour étudier le comportement du fuseau entre plusieurs conditions nous avons développé un programme d'analyse du comportement du fuseau à plusieurs paramètres. Ce programme permet de comparer une population de cellules entre différentes conditions. L'application au modèle SW480 a montré une augmentation de la dynamique des fuseaux dans les cellules SW480-APC.

L'ensemble de ces résultats est présenté sous la forme d'une version encore provisoire d'un article qui sera soumis prochainement. Je prie les rapporteurs et examinateurs de bien vouloir accepter cette version qui ne comporte pas l'ensemble des résultats détaillés dans le texte.

**Traitement des cellules par ARN interférent contre la CLIP-170 pour tester les fonctions de la Dynéine** Dans le but d'évaluer l'implication de CLIP-170 dans l'adressage cortical du complexe Dynéine/Dynactine et les fonctions de la Dynéine en mitose nous avons effectué une analyse phénotypique de la diminution de CLIP-170 par ARN interférent. Nous avons pu reproduire les phénotypes déjà décrits, à savoir une prolongation de la mitose, et un problème d'alignement des chromosomes à la plaque métaphasique. Ces résultats, bien que préliminaires, montrent un rôle de CLIP-170 dans l'accumulation au cortex de la Dynactine. De plus un effet sur la réorientation et l'alignement des fuseaux est observé, mais avec des conclusions différentes dans les deux lignées SW480. Ces résultats sont présentés sous forme d'un rapport page 121.

**Analyse morphométrique des cellules en divisions dans la niche** A cause de la configuration spatiale de la niche nous n'avons pu effectuer des mesures d'orientation. Néanmoins nous avons tenté d'analyser à l'aide d'un outil morphométrique les cellules en division dans la niche. Nous nous sommes intéressé en particulier à examiner la situation pour le pôle apical dans des cellules en anaphase/telophase. La difficulté de trouver des cellules remplissant les conditions d'analyse a fait que cette étude reste très préliminaire. Nous avons cependant montré la faisabilité d'une telle approche, et ainsi ouvert la voie à de possible étude de localisation asymétrique de protéines dans les cellules de la niche, comprenant les cellules souches.

# **APC contributes to crypt homeostasis through control of Oriented Cell Division.**

Julien Bellis<sup>1</sup>, Isabelle Duluc<sup>2</sup>, Béatrice Romagnolo<sup>3</sup>, Christine Perret<sup>3</sup>, Maree C. Faux<sup>4</sup>, Denis Dujardin<sup>1</sup>, Jean-Noël Freund<sup>2</sup>, Jan R. De Mey<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, UMR 7213 CNRS - Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch, France

<sup>2</sup> Unité mixte Inserm-ULP 682, 3 av. Molière, 67200 Strasbourg

<sup>3</sup> Institut Cochin, Université Paris Descartes, INSERM U567, CNRS (UMR 8104), 24 rue du Fb St Jacques, 75014 Paris, France

<sup>4</sup> Ludwig Institute for Cancer Research, Parkville, Victoria 3050, Australia

**Homeostasis of the continuously renewing intestinal epithelium is based on proliferation and ribbon-type migration of cells along the crypts, fuelled by stem cells. Here, we show that oriented cell division (OCD), an indicator of planar cell polarity (PCP), operates in colon crypts. Analysis of 3D spindle orientation in intact crypts, after genetically-mediated loss of function of *Apc* and in cancer prone *Apc*<sup>+/-</sup> mice models, indicates that this tumour suppressor gene is required for OCD. In an in vitro gain of *APC* function cell model, APC also affects the dynamics of spindle positioning in living cells. Thus, APC is not only involved in the canonical Wnt pathway and chromosome segregation, but its deficiency also perturbs the OCD aspects of non canonical Wnt/PCP signalling, possibly contributing to early events in colon cancer development.**

## **Introduction:**

The intestinal epithelium is continuously and rapidly renewing, requiring tight control over tissue homeostasis. The latter is based on coherent proliferation and ribbon-type migration of polarized epithelial cells along tubular-shaped crypts, fuelled by a limited number of stem cells, maintained at their base[1,2]. Much remains to be learned on the cellular and molecular mechanisms and the signalling pathways governing this morphogenetic system, and on how it becomes cancerous. Monoallelic germinal mutations in the *APC* tumour suppressor gene strongly predispose to familial colorectal cancer, whereby tumorigenesis is initiated upon secondary loss or inactivation of the wild-type allele (LOH)[3,4]. Macroscopically, LOH of *APC*, and thus the replacement of wild-type APC protein by an N-terminal fragment[5], generates the formation of aberrant crypt foci (ACF) in which epithelial homeostasis and morphogenesis is perturbed and which are believed to represent the first step towards adenoma development[6]. Why APC is such a potent tumour suppressor is not entirely elucidated, but thought to be linked to its multidomain structure and hence, the multiple roles in Wnt-dependent cellular signalling, cell-cell adhesion and cytoskeletal functions in interphase and mitotic cells[3,7]. N-terminal APC fragments persisting upon LOH induce nuclear  $\beta$ -catenin translocation and aberrant canonical Wnt-signalling activation, leading to inappropriate cell proliferation and crypt fission[8], and diminished cellular differentiation[4]. *In vitro*, in non-polarized adherent cells, the reduction of APC levels by siRNAs and the co-expression of N-terminal APC fragments in an *APC*<sup>+/+</sup> background, induce problems with chromosome segregation, mitotic spindle positioning, and cytokinesis[9-12]. Contrary to this, *in vivo* genetic analysis involving assays probing for effects of the complete loss of the APC1 and APC2 proteins, and for dominant negative effects of N-terminal APC fragments in *Drosophila* syncytial embryos and follicular epithelial cells of the egg chamber, failed to show an essential role for these proteins in cell viability, cadherin-based adhesion, spindle assembly, orientation or selection of division plane[13], as predicted from other studies[14-17]. It was instead hypothesised that certain N-terminal APC fragments may have dominant effects on processes in which APC does not play an essential role[13].

Epithelia have an essential barrier function that must be kept intact during cell division, especially in rapidly proliferating systems like intestinal crypts. In order for both daughter cells to become integrated into the epithelial monolayer, without breaking its barrier function, cell division is polarized with respect to the cell's apico-basal polarity, and the division plane is usually perpendicular to the plane of the epithelium[18]. In the intestinal crypt, this

symmetrical epithelial cell division is found in the transit amplifying cells, the rapidly proliferating immediate off-spring of the stem cells[19]. Polarization of cell division is also crucial for asymmetric cell division of intestinal stem cells, the process that keeps one daughter cell in a stem cell pool after mitosis, while the second joins the pool of differentiating cells[3]. The plane of partitioning is dictated by the orientation of the mitotic spindle during metaphase and coincides with the chromosomal equatorial plate. This involves planarly aligning the spindle in rounding cells, detaching from the basement membrane and maintaining the apico-lateral junctions[18]. In non polarized adherent cells, spindles align in an extracellular matrix, integrin- and PI(3)Kinase-dependent manner[20-22], whereas in polarized epithelial cells, they align in a PI(3)Kinase-independent manner[21]. Therefore, in epithelia, additional mechanism(s) for spindle orientation may operate, and although these remain largely unknown, evidence for a role for apico-basal polarity and cell-cell adherens junctions has been accumulating from studies in insect epithelia. Here, it clearly depends on E-cadherin-dependent junctions[15,23]. With this respect, it is worthwhile noting that in mammalian epithelia, truncated forms of APC fail to associate to lateral plasma membranes and activate the Rac-specific nucleotide exchange factor, which compromises E-cadherin-dependent adhesion[17,24-26], and that the microtubule-associated motor complex dynein/dynactin and some of its partners have been shown to be gathering in cortical sites located near these cell-cell adhesion sites, and be required for symmetrical cell division[27-30]. Human APC could also be active by binding via its very C-terminal domain to several components which play a role in spindle orientation and cell-cell adhesion in insect epithelia: the microtubule-associated protein EB1, and the tumour suppressors hDlg (human Disc large) and hScrib (human Scribble) (reviewed in[3,7]), which is evolutionary conserved in vertebrate epithelia[31].

Early work had indicated that a high proportion of mitotic spindles are oriented parallel to the long axis of crypts[32,33], but another report indicated that the spindle axis may occupy a random position with respect to the crypt axis[34]. This aspect of spindle orientation has since then not been investigated systematically, although in the light of present day's knowledge, it is potentially of great importance. When a large majority of spindles are longitudinally aligned with a tissue axis, and also planarly aligned with the plane of the cell monolayer, Oriented Cell Division (OCD) is said to be operational[35,36]. OCD contributes to many morphogenetic events such as gastrulation[35], wing shaping in insects[37] and the maintenance of a constant diameter during renal tube lengthening[38]. Very recently, it was shown that in mouse embryos, OCD is one of the essential components in fore-stomach

morphogenesis[39]. OCD is controlled by planar cell polarity (PCP) signalling and as such an excellent indicator of this pathway. In support of a role for APC in symmetric cell division in mammalian epithelia, some perturbation of polarized cell division in normal crypts heterozygous for the APC(min) mutation, and more in tumours has been reported[40,41], but no distinction between planar and longitudinal components of the spindle alignment was made. OCD and PCP are regulating asymmetric division of stem cells in the sensory precursor organ (SOP) of insects[42]. With this respect, it is relevant that in normal human colon crypts, the stem cell marker Lgr5[43] is expressed in the stem cell niche, at the base of crypts, as seen in mice. However, in premalignant crypts, Lgr5<sup>+</sup> cells were found to be not restricted to the crypt base, and their overall numbers to be increased, indicative of a loss of control over their self-renewal upon LOH of APC.

The data introduced above, indicated to us that characterizing spindle orientation in the colon crypt in all its components and challenging the implication of APC in these processes would contribute to better understand its role as a gatekeeper preventing tumorigenesis. Our strategies towards these goals have been to characterize spindle orientation *in vitro*, in living cultured epithelial cells expressing an N-terminal fragments of APC alone, or together with wild-type APC, and *in vivo*, in fixed intact colon crypts of three murine models of predisposition to intestinal cancer linked to monoallelic germ cell *Apc* mutation, the *Apc*<sup>1638N/+</sup>, *Apc*<sup>Min/+</sup> and *Apc*<sup>Δ14/+</sup> mice[5,44]. The results presented below indicate that, along with the constitutive activation of the canonical Wnt pathway, and the alteration of chromosome segregation and stability, the loss of function of *Apc* also perturbs non canonical Wnt/PCP signalling resulting in defects in OCD, which could be the reason for the increased number of stem cells observed in mice and human tissues upon LOH of APC.

## **Results:**

### **SW480-APC cells display improved apico-basal polarity which is maintained during mitosis**

SW480 colon cancer cells express a 1338 amino acid APC truncation[45] and show reduced E-cadherin-dependent cell-cell adherent junctions, whereas SW480-APC cells derived by stable expression of wt-APC[25] have reduced canonical Wnt signalling and restored E-cadherin-dependent cell-cell adherent junctions. This is further supported by our observation that they have an increased  $\alpha$ -catenin staining at the membrane (Fig. 1a). Two observations indicated in addition that SW480 cells have acquired at least some degree of apico-basal

polarity. First, the distribution of ZO1 changed from an interrupted pattern in SW480 cells to a more continuous pattern (Fig. 1a). Second, whereas most SW480-Vector cells rounded up during mitosis, with an almost total loss of the interphase morphology and contacts to neighbouring cells, SW480-APC cells rounded up much less. This was corroborated by measurements showing that in living SW480 cells recorded during metaphase of mitosis, 88% of the roundness values *C* were under or equal to 1, against only 52% in SW480 APC cells (See Methods and Figs. 2, 3 and 4a). Taken together, these data suggested that expression of APC in SW480 cells improves apico-basal polarity.

### **SW480-APC cells display normalised metaphase duration and improved kinetochore-microtubule attachment**

SW480 cells display chromosome instability (CIN) because of impaired kinetochore-microtubules attachment[46] and probably also because of the aberrant Wnt/[47]-catenin signalling [48]. In human *APC<sup>+/+</sup>* cells, it had been shown that expressing cancer causing N-terminal APC fragments is extremely toxic, and impairs mitotic spindle function, checkpoint regulation, and cytokinesis[9-11]. It was therefore important to assess whether SW480-APC cells displayed mitotic phenotypes. In order to assess this, we determined in 100 cells of each clone the durations of prometaphase, metaphase and the sum of these (see Supplementary Methods).

Mitotic Phase	SW480 Vector	%	SW480 APC	%
Prometaphase	8.7 ± 3 min	45	7.8 ± 2.8 min	33
Metaphase	10.5 ± 4 min	55	15.4 ± 6 min	67
Prometaphase + Metaphase	19.2 ± 4.5 min	100	23 ± 5.7 min	100

The duration of prometaphase plus metaphase in SW480-APC cells was increased by 20 % (compare 23 ± 5.7 min to 19.2 ± 4.5 min; p-value = 1.5e-07). Interestingly, this was exclusively due to an increase of 46 % of the metaphase duration (compare 15.4 ± 6 min with 10.5 ± 4 min, p-value = 5.2e-10), with the ratio prometaphase/metaphase changing from 45/55 to 33/67. Performing the same analysis with MDCK II cells, a non-transformed polarized epithelial cell line, we found that their ratio is 36/64. In order to assess this further, we

compared the quality of chromosome congression and bivalent attachment of chromosomes to the mitotic spindle in the two SW480 cell lines. We confirmed that in SW480 cells, the chromosomes showed defective bivalent attachment[46]: CLIP-170, used here as an indicator for kinetochore-microtubule attachment[49], was not removed efficiently from the kinetochores of metaphase cells (Fig. 1b), and the kinetochores were not well aligned along the spindle axis (Fig. 1c). In SW480-APC cells on the contrary, CLIP-170 was efficiently removed (Fig. 1b), and the kinetochores were better aligned (Fig. 1c). The short metaphase duration in SW480 cells as compared to MDCK and SW480-APC cells is consistent with a defective mitotic checkpoint as measured by other approaches[9,11]. The normalisation of metaphase duration and the repaired bivalent chromosome attachment to spindle microtubules in SW480-APC cells indicate that the expression of a small amount of fl-APC in SW480 cells does not impair mitotic progress, but rather improves spindle assembly and kinetochore-microtubule attachment, possibly repairing the mitotic checkpoint.

### **Mitotic spindles of MDCK cells can display reorientations and continuously display angular oscillations around a fixed orientation**

Since SW80-APC cells had restored at least some degree of apico-basal polarity, we reasoned that it may provide a model to study the consequences of the loss of functions, associated with the C-terminal half of APC, in particular with respect to spindle behaviour in cultured polarized epithelial cell. So far, however, spindle behaviour in such cell had not yet been analysed. We therefore decided to analyze spindle behaviour in MDCK II cells, in which the key features of spindle orientation have been well documented by high resolution cytology[18]. Using the methods introduced in the Methods section and in Figures 2 and 3, we monitored the following parameters cells progressing through metaphase: cell roundness, spindle alignment with the substrate, spindle displacements within the cell boundaries, and rotational displacements. Metaphase MDCK cells display very few roundness values where  $C$  exceeded 1.5 (Fig. 4a). The analysis of planar spindle alignment determined from the ratio between the long and short spindle axes showed that 93 % of the values were between 0.3 and 0.7, considered to be well aligned planarly (Fig. 4b). The one of spindle displacements showed that 65 % of the values for  $D$ , the inter-centroid distance, are less than or equal to 1  $\mu\text{m}$  (Fig. 4c), and 80 % of those for  $D1 - D2$ , the difference between the metaphase plate to the cell boundaries, are under or equal to 2  $\mu\text{m}$  (Fig. 4d). Measurement of the  $\Omega$  angle at the beginning and the end of metaphase showed that more than 70 % of the cells had reoriented their spindle for less than  $30^\circ$  whereas 25 % displayed more extensive reorientations ( $\geq 30^\circ$ ).

65 % of the  $\Omega$  values measured during metaphase for all the cells are in the  $-20^\circ$  to  $+20^\circ$  range (Fig. 4e). In spite of this apparent stability, the spindles displayed numerous smaller bidirectional and oscillatory displacements, as revealed by the accumulation of  $92 \pm 62^\circ$  of oscillation during metaphase yielding a mean  $\Omega$  value of  $9 \pm 4^\circ/\text{min}$ . Together, this analysis shows that metaphase MDCK cells retain a near to circular shape. Once they have planarly aligned their spindle with the substrate, they maintain it like that until the onset of anaphase. The chromosomes do not move far away from the cell centroid and in spite of the fact that  $\frac{3}{4}$  of the cells find and keep the spindle orientation reached at anaphase rather soon, the spindle actively oscillates back and forwards. It is interesting to note that this behaviour strongly resembles the one described for epithelial cells of the rat retina[50] in which the vast majority of the cells did not reorient their spindles for more than  $19^\circ$ , and the  $\Omega$  value was  $6.34 \pm 3.84^\circ/\text{min}$ . Thus, during metaphase, polarized epithelial cells dispose of efficient mechanisms enabling them to achieve and maintain planar spindle alignment. Despite the fact that they normally do not reorient their spindle, they have the capacity to do so, and they continuously display frequent angular displacements visible as oscillations around a fixed orientation.

**APC is required for the capacity of polarized epithelial cells to reorient and oscillate back and forward the mitotic spindle, but not for planarly aligning it**

We next applied these methods to the SW480-APC clones. Metaphase SW480-APC cells remain more spread than SW480 cells, probably because they maintain the tight junctions intact. In SW480 cells, 65 % of the values for the inter-centroid distance are less or equal to  $1 \mu\text{m}$  whereas in SW480-APC cells only 26 % fell in this range (Fig. 4c). This is consistent with the D1-D2 values: in SW480 cells, 80 % are under or equal to  $2 \mu\text{m}$ , whereas in SW480-APC cells, this is the case for only 46 % (Fig. 4d). It thus appears that because SW480-APC cells remain more spread their spindles can move further away from the cell centroid compared to SW480-Vector cells. With this respect, SW480-APC cells do not resemble MDCK cells, which are smaller and round up more towards the apical poles during mitosis. Values for long/short spindle axis ratios ranging from 0.3 to 0.7 were 83 % for SW480 and 84 % for SW480-APC cells (Fig. 4b). Probing for spindle reorientation revealed more differences between our two SW480 cell lines. Indeed, 90 % of SW480 cells had their final orientation determined already at the beginning of metaphase, against only 73% for SW480-APC cells, implying that in metaphase SW480-APC, about  $\frac{1}{4}$  of the spindles underwent rotational reorientation. In SW480 Vector cells, 78 % of the  $\Omega$  values fell in the range from -

20° to +20°, whereas in SW480-APC cells, this was the case for only 57 %. Here, the frequencies around 0° make up only 20% compared to 30% for SW480 cells (Fig. 4e). This is correlated with the presence of values above 30° in SW480-APC cells which are totally absent in SW480 cells. In addition, the mean cumulated  $\Omega$  values were  $46.3 \pm 26.6^\circ$  and  $93.5 \pm 62.5^\circ$  for respectively SW480 and SW480-APC cells, (p-value =  $1.5e-10$ ), yielding  $\Omega/\text{min}$  values of respectively  $4.5 \pm 2.1^\circ$  and  $6 \pm 2.5^\circ$  for SW480 Vector and SW480-APC cells (p-value =  $5.7e-06$ ). In conclusion, these results show that the spindle behaviour of SW480-APC cells resembles that of polarized epithelial cells. In such cells, the capacity to planarly align the spindle with the substrate is not dependent on functions of intact APC, associated with the C-terminal half of the molecule. On the contrary, the capacity to reorient it over more than 30°, and to oscillate it back and forward, is dependent on these functions.

### **Oriented Cell Division (OCD) is operating in the colon crypt**

The colon crypt was used as a model to challenge the role of APC in spindle orientation *in vivo*. We developed a 3D recording method for measuring division orientation in transit amplifying cells of intact crypts. In the fixed tissue fragments, the cell periphery and apico-lateral actin-rich belt were visualized through F-actin staining, spindle poles were labelled with gamma tubulin antibodies and DNA with DAPI (Fig 5). 3D spindle orientation measurements are based on calculation of two angles, according to Gong and Fraser[35] (Fig 5b and Supplemental Video 1). We considered the longitudinal axis of the crypt, the plane 1 defined by the apical plane of each mitotic cell and the line of the spindle axis passing through the two poles (Fig. 5e). Accordingly, alpha corresponds to the angle between the projections of the spindle axis and crypt axis on plane 1 hereafter referred to as “longitudinal alignment” (Fig5e’1). Beta corresponds to the angle between the same projections on plane 2, perpendicular to plane 1, hereafter referred to as “planar alignment” (Fig.5e’2). Variations of angle alpha influence the diameter-to-length ratio of the crypt, whereas variations of beta determine whether the two daughter cells stay within the cell monolayer or whether one cell delaminates[51] (Fig. 5e’). In wild-type mice, we found that the mean alpha angle is  $20 \pm 18^\circ$  (Fig. 5f,f’). 80% of the spindles had an alpha angle inferior or equal to  $30^\circ$  (Fig. 5c,c’), while a sub-population displayed alpha angles up to  $90^\circ$  (Fig. 5d,d’). The mean beta angle is  $7 \pm 5^\circ$ , with  $> 90\%$  of cells having a beta angle inferior or equal to  $20^\circ$  (Fig. 5g,g’). Thus, the high resolution technique developed here firmly establishes that a large majority of spindles are longitudinally aligned with the crypt axis, and also planarly aligned with the plane of the cell monolayer, which fulfils the criteria of Oriented Cell Division (OCD)[35,36].

### **OCD in colon crypts depends on APC**

We next explored the possibility that OCD in colon crypts depends on APC. To this end, the *Apc* gene was specifically ablated in the gut epithelium of floxed-*Apc* x Villin-CreERT2 mice treated with tamoxifen, as described[52]. Five days after tamoxifen injection, intense cell proliferation and dramatic enlargement of the colon crypt compartment (Fig. 6b), confirmed efficient *Apc* loss. The crypt lumen lost its cylindrical shape, and the apico-lateral actin-rich belt disorganised (Fig. 6b). *Apc* ablation led to significant perturbation of alpha and beta angles compared to wt animals. The mean alpha angle was  $44^\circ \pm 24^\circ$  ( $p = 0.001$ ) following *Apc* loss compared to  $20^\circ \pm 18^\circ$  for wt mice, with only 30% of APC deficient cells displaying an angle inferior or equal to  $30^\circ$  (Fig. 7a,c,d; Fig S1b). The mean beta angle increased from  $7^\circ \pm 5^\circ$  in wt mice to  $18^\circ \pm 11^\circ$  ( $p = 0.003$ ) in APC deficient mice, with one third of cells above  $20^\circ$  (Fig. 7b,e,f; Fig S1b). Thus, OCD is dramatically perturbed upon sudden loss of APC demonstrating that APC is required for proper OCD in colonic crypts.

### **Monoallelic mutation of the *Apc* gene do not perturb OCD in crypts of the colon and small intestine**

Monoallelic mutation of the *Apc* gene is predisposing to intestinal tumorigenesis in human and mice. Thus, OCD was assayed in the colon of three murine models carrying one mutated *Apc* allele: *Apc*<sup>1638N/+</sup> mice, considered as a haploinsufficiency model[5], and *Apc*<sup>Min/+</sup> and *Apc*<sup>Δ14/+</sup> mice[44,53]. The normal-looking crypts of the colon from any of these *Apc* mouse models as well as the small intestinal crypts of *Apc*<sup>Min/+</sup> fail to exhibit any significant difference in alpha and beta angles compared to wild-type mice (Fig 7 and Fig S1). This shows that neither the reduction of APC levels nor the co-existence of a full length and a truncated form of APC, perturb OCD.

### **In aberrant crypt foci of *Apc*<sup>Δ14/+</sup> mice, only longitudinal spindle alignment is dependent on intact APC**

Tumour development in these *Apc* mutant mice starts upon sporadic loss of the wild-type *Apc* allele, generating the formation of aberrant crypt foci (ACF) which represent the first macroscopic step towards adenoma development. Therefore, we micro-dissected ACF from fixed colons of *Apc*<sup>Δ14/+</sup> mice, stained with methylene-blue to visualise them under a binocular microscope. The micro-dissected structures were shown to correspond to ACF since crypts

were longer and larger than normal crypts (Fig. 6c), the crypt lumen lost its cylindrical shape with perturbations in the regular polygonal actin appearance at the level of the junctions (Fig. 6c), and up to 11 mitosis were counted per crypt instead of 2~4 in normal crypts (fig. 6d). As shown in Fig 7 and Fig S1, the mean alpha angle in ACF was  $34 \pm 25^\circ$  and 60 % of the spindles displayed an alpha angle inferior or equal to  $30^\circ$ , which is statistically different from the crypts of wild type animals and from the normal-looking crypts of *Apc* <sup>$\Delta 14/+$</sup>  mice (p-value = 0.001). In contrast to sudden loss of APC in the Cre/lox model, the mean beta angle in ACF from  $\Delta 14/+$  crypts was similar to wt and normal  $\Delta 14/+$  crypts ( $8^\circ \pm 6^\circ$  ACF  $\Delta 14/+$ - compared to  $7^\circ \pm 5^\circ$  and  $8^\circ \pm 8^\circ$ , respectively; p-value = 0.700) (Fig. 7b, S1b). OCD is therefore affected upon LOH of *Apc* in the early stages of colon tumorigenesis and differences in the alpha angle but not beta angle indicate that longitudinal alignment is more dependent on intact APC than planar alignment.

## Discussion

The goal of this study has been to characterize spindle orientation in the colon crypt in all its components, and testing the implication of APC in this process in order to better understanding its role as a gatekeeper preventing tumorigenesis. The high resolution determination of two relevant angles in intact crypts firmly establishes OCD in small intestine and colon crypts, which are the first examples of rapidly renewing tissues, in which OCD contributes to their morphogenesis. It also describes the alterations resulting from loss of function of APC and LOH in *Apc* <sup>$\Delta 14/+$</sup>  mice, a model for studying the first steps of tumorigenesis in the colon. The finding that OCD in colon crypts is perturbed by tamoxifen induced local gene inactivation provides definitive proof that in mammalian epithelia, both planar and longitudinal spindle alignment are dependent on APC, planar alignment being somewhat less dependent. In insect tissues, studies of the role of dAPC1 and dAPC2 have lead to contradictory results with regard to planar spindle alignment[13,15]. It will be interesting to measure division angles in tissues like the developing wing[37] or the pleura of the abdomen[54] in which OCD contributes to morphogenesis. Contrary to previous reports[40,41] of some perturbation of cell division orientation in normal-looking small intestine crypts of *Apc* <sup>$Min/+$</sup>  mice, our more precise measurements reveal that both planar and longitudinal spindle alignment were completely unaltered in normal colon (and small intestinal) crypts of this and two other murine models of predisposition to intestinal cancer linked to monoallelic germ cell *Apc* mutation. The presence of a sufficient amount of wild-

type APC protein appears therefore sufficient for polarized cell division and OCD to be normal, and the co-existence of wild-type APC and n-terminal APC fragments does not seem to lead to a dominant negative effect on OCD. In our study, the incidence of such an effect of N-terminal APC fragments on cytokinesis[40] was not investigated.

Data from polarized MDCK cells had led to the hypothesis that adherens junctions and the underlying microfilaments play a major role in regulating polarized cell division[18,27]. Our characterisation of the SW480/SW480-APC cell model has validated it as excellent for testing the involvement of wild-type APC and apico-basal polarity in orienting cell division. Planar alignment of the spindles is efficient in the presence of the N-terminal APC fragment alone, but the capacity to reorient the spindles and oscillate back and forward, which we found to be typical for polarized epithelial cells, is dependent on intact APC. This result is consistent with our finding that in vivo, longitudinal, but not planar, alignment is perturbed in ACF of the colon in *Apc*<sup>Δ14/+</sup> mice. Together, these observations support the existence of at least two mechanisms operating in mammalian epithelial cells, one for planarly aligning the spindle, not requiring intact APC, and the other for aligning a spindle with a secondary tissue polarity axis, requiring intact APC and apico-basal polarity. This hypothesis is consistent with the finding that in the forming intestinal gut epithelium, OCD involves Wnt5a-dependent PCP signalling which modulates apico-basal epithelial cell polarity[39].

Another mammalian proliferating tissue displaying OCD and PCP is the regenerating renal tube[55]. Recent research has revealed a link between Wnt signalling and polycystic kidney disease. Polycystic kidney disease proteins, such as Inversin and Bardet-Biedl syndrome family members apparently use components of the Wnt signaling cascade to orient cells along the long axis of the renal tube[56]. Inversin is also playing a role in cell division[57]. PCP signalling comprises at least two separate pathways, the non-canonical Wnt-signalling Frizzled/Flamingo pathway and the Fat/Dachsous pathway[54], both involved in cycling mammalian epithelia[39,58]. Further work will have to address whether both pathways are involved in the colonic crypt, whether the proteins identified in the kidney also contribute to intestinal crypt morphogenesis and homeostasis, and the molecular basis for the involvement of APC.

Since our data show that *Apc* deficiency affects OCD, it is likely that in the intestinal epithelium it also weakens non-canonical Wnt/PCP signalling. In support of this, an APC-

dependent signalling pathway involving Cdc42 and the Par6/aPKC complex, and Wn5a-dependent non-canonical Wnt signalling collaborate in migrating fibroblasts for centrosomal reorientation, microtubule polarization, and cell polarity[59]. Therefore, also in humans, LOH of *APC*, which is a primary event in colorectal cancer, may result in the combination of several deleterious effects, including a constitutive activation of the canonical Wnt pathway, a defect in chromosome segregation and stability, and a decline of the non-canonical Wnt pathway[60,61]. Non-canonical Wnt signalling is regulating asymmetric division of stem cells in the sensory precursor organ (SOP) of insects[42] and counteracts canonical Wnt-signalling[61]. Our findings therefore imply that in intestinal crypts, APC may be involved in regulating asymmetric division of stem cells, and thereby regulate their number per crypt, which is augmented early on in the tumourigenic pathway[2,62,63]. Confirmation of this hypothesis is now possible with the availability of long-term culture conditions under which single crypts can be maintained or even generated from single stem cells[1].

## **Methods**

### **Immunofluorescence**

Cells were plated at  $8 \cdot 10^5$  cells on coverslip in six well plates and fixed three days later. They were processed for immunofluorescence and mounted in Prolong Gold (Molecular Probes). Stacks of metaphase cells were recorded using brightfield fluorescence microscopy (Leica AS MDW system), and deconvolution was performed using Leica Deblur and blind deconvolution. The alignment of the axis between centromere doublets (labelled by CREST antibodies) with the spindle axis (determined from the CLIP-170 labelling at the spindle poles) was determined by placing 3D marks using Imaris Software, and calculating the angles from the x,y,z coordinates using Matlab.

### **Analyzing spindle behaviour in SW480, SW480-APC and MDCK cells**

Data sets on  $> 100$  mitotic cells were obtained using multipositioning time lapse microscopy, and recording the signals from Hoechst labelled chromatin and phase contrast (and in addition EB1-GFP in the MDCK clone, Fig. 2a). After extracting and compiling in files individual mitotic events, the contour of the cell and the chromatin (Fig. 2b) were exported as text files containing X,Y coordinates for the cell and the chromatin contours. These coordinates were used for the subsequent calculations under Matlab, for each cell, of the following parameters:

Duration of Prometaphase and Metaphase; 2) Deviations of cell shape from roundness; 3) Variations of the spindle axis alignment with the substrate (Fig. 2 c1), 4) Positional changes of the chromatin mass within the cell boundaries (Fig. 2 c2), 5) Spindle reorientations in the plane of the monolayer provided by  $\Omega$ , the angle between the instantaneous metaphase plate orientation and that at the onset of anaphase (Fig. 2 c3 & c4). This yielded time plots for individual cells (Fig. 2 c). For comparing these parameters in cell populations from different cell lines, a mean frequency approach was used. For each parameter and cell, the frequency of each recorded value was determined, and then assembled in a mean frequency histogram (figure 2 d for a frequency per cell histogram for the  $\Omega$  values in 100 cells), from which a cumulative frequency diagram representative for the entire population was calculated (Fig. 2 e). In addition, the  $\Omega$  values were also summed for each cell to give a measure of the total rotational movement during metaphase (Fig. 2 c4). The average change of  $\Omega$  per minute of metaphase gives a measure for the capacity of the cells to change the orientation of their spindle by rotational movements in the plane of the monolayer.

### **Multipositioning time lapse microscopy**

A Leica DM IRBE inverted microscope equipped with a Märzhäuser motorized stage, a 75 W XBO W/2 OFR Xenon lamp, and a 40 x 0.5 N.A. objective was used. Cells were plated on 18 mm diameter cover slips, two days before acquisition in order to obtain near confluent cultures. Cover slips were mounted in a Ludin chamber (Life Imaging Services, Basel). Cells were kept at 5% CO<sub>2</sub> atmosphere with a Brick chamber (LIS, Basel), and the microscope was kept at 37°C in a climate box branched on the Cube (LIS, Basel). Tests performed over more than two days, showed no problem of cell viability. Up to 15 fields per time point were acquired. Typically, time-lapses of 3 hours were performed, with acquisition of one field image every minute in both the fluorescent channel (Hoechst staining and GFP when applicable) and phase contrast.

### **Mitotic phase duration**

In order to analyse mitotic duration, we used the Hoechst signal to determine in 100 cells of each clone the durations of prometaphase (from nuclear envelope breakdown to metaphase plate formation), metaphase (from metaphase plate formation to the onset of anaphase) and prometaphase + metaphase (from nuclear envelope breakdown to the onset of anaphase).

### Feature extraction (see also Fig 2)

From each field every mitotic event is extracted and compiled in separate files. From this file the contour of the mitotic cell is extracted manually using the measurement tools of Metamorph and the contour of the chromosomes is extracted by automatic segmentation on the intensity of the Hoechst signal. Per time point, each cell yields around 200 X,Y coordinates for the cell contour and 100 for the chromosomes contour, which are exported in text files. Subsequent calculus of the different parameters for the analysis, were made using custom written Matlab programs.

### Calculation of the parameters defining spindle behaviour (see also Fig. 3)

#### Cell roundness

The cell roundness is a parameter that varies from 0 for a perfect circle to 3 and more for oblong shapes. For one plane the distance from the centroid mass to every point is summed and then divided by the number of points (1), which gives a 'mean' diameter for the cell. For every point the distance to the centroid is computed (2), and the absolute difference to the mean value (3) is summed and divided by the number of points (4), which gives a mean value of the difference to the mean diameter.

$$mdc = \frac{\sum_{i=1}^n \sqrt{(Xi - Xc)^2 + (Yi - Yc)^2}}{n} \quad (1)$$

$$dpop(i) = \sqrt{(Xi - Xc)^2 + (Yi - Yc)^2} \quad (2)$$

n being the number of points for the cell boundary and Xc and Yc the coordinates of the cell centroid

$$dmean(i) = |mdc - dpop(i)| \quad (3)$$

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n dmean(i)}{n} \quad (4)$$

### **Metaphase plate short axis determination**

The determination of the spindle axis involves finding the moment of inertia considering the points delimiting the chromosomes as a cloud of points. X,Y coordinates are given as a matrix of two columns, which is computed using the covariance function (5) under Matlab. The maximum eigenvalue of the matrix is found using the eig function (6).

$$R = \frac{n-1}{n} \times \text{cov}(C) \quad (5)$$

where n is the length of the C vector

$$\text{delta} = \max(\text{eig}(R)) \quad (6)$$

$$S = [R(4) - \text{delta} \quad -R(2)] \quad (7)$$

The short axis is determined by finding the orthogonal vector using the transform matrix (8)

$$T = \begin{bmatrix} 0 & -1 \\ 1 & 0 \end{bmatrix} \times S \quad (8)$$

### **Ratio of long axis to short axis of the chromosomes**

From the determination of the short axis of the chromosomes (see above) the long axis is determined as the perpendicular axis to the short. The ratio of the long axis divided by the short axis is then computed, and used as a degree for the planar alignment of the spindle axis with the substrate. The ratio varies from 0 to 1, and values ranging from 0.3 to 0.7 are considered to correspond to a correct planar alignment.

### **Inter-centroid distance**

Cell and chromosomes centroids are calculated on every plane using mean over all X and Y coordinates (9).

$$X_c = \frac{\sum_{i=1}^n X_n}{n}; Y_c = \frac{\sum_{i=1}^n Y_n}{n} \quad (9)$$

### **Distance between the metaphase plate and cell boundary**

The distance from the chromosome mass to the cell boundary is determined using the short axis of the chromosome mass. The absolute difference  $D1 - D2$  (10) is computed for every plane of the acquisition.

$$D(i) = \left| \sqrt{(X_{ma} - X_{ca})^2 + (Y_{ma} - Y_{ca})^2} - \sqrt{(X_{mb} - X_{cb})^2 + (Y_{mb} - Y_{cb})^2} \right| \quad (10)$$

### **Metaphase plate reorientation**

Starting from metaphase plate assembly to anaphase onset, the computed long axis of the metaphase is used for calculating the angle  $\Omega$  between every position of the plate and the last position before anaphase onset. The computed short axis of the metaphase plate is used as the axis giving the orientation of the spindle. If the ratio of the long axis to the short axis of the chromosome mass is greater than 0.8 the cell is visually checked to determine if the metaphase plate orientation can be trusted.

### **Preparation of colon or small intestine samples**

Mice were anesthetized and opened for dissection. The distal colon or jejunum segments were opened and immediately washed with a solution of warm (37°C) PHEM (60 mM Pipes, 25 mM Hepes, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) and fixed for 40 min at room temperature in 3% paraformaldehyde in PHEM, supplemented with 15  $\mu$ M taxol. At the start of fixation the tissue was reduced into smaller fragments. These were then rinsed 3 times in PBS, and stored at 4°C in a PBS/NaN<sub>3</sub> solution for maximally one month.

### **Isolation of ACF**

For ACF isolation the colon was fixed and incubated with methylene blue. ACF were visualised by trans-illumination, extracted with fine needles and collected in an Eppendorf tube.

### **Immunolabeling of intact crypts**

Using two very thin needles, fragments were micro dissected to remove the muscle lining. All

subsequent steps were performed in an Eppendorf tube. They were treated for 1h with 200  $\mu$ M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in PBS, permeabilised for 1h in 3 % Sodium Deoxycholate in  $\text{H}_2\text{O}$ , and for 30 min in 0.5%Triton-X-100 in PBS, and subsequently blocked for 30 min in TBS/BSA 1%/Triton 0.2%. Primary and secondary antibody dilutions were made in the same solution. Incubations with the first (1 ml) were 2 h at room temperature, followed by overnight at 4°C. Fragments were rinsed three times and incubated during 2 h with secondary antibody (containing Phalloïdin-rhodamine) at room temperature and during 4 h at 4°C. They were rinsed 3 times, incubated in DAPI (5  $\mu$ l of a 1 mg/ml stock solution in 10 ml of TBS) for 20 min, rinsed in TBS and mounted using Prolong Gold medium (Molecular Probes). They were deposited and their orientation (long axis lying along the coverslip) corrected using a fine needle. TBS was then removed to leave the fragments almost dry, mounting medium quickly added, and covered by a cover-slip.

### **Fast confocal microscopy**

Images were collected using a 63 $\times$  NA 1.4 lens on a scanning confocal microscope (Leica SP5). Scanning was performed in resonance mode (8000 Hz) allowing fast acquisition, with 8x averaging/plane/per channel. An acquisition typically consisted of 60 planes, with a Z step of 0.5  $\mu$ m and a pixel size of 141 nm.

### **Spindle orientation measurements**

Using Imaris software, image stacks of crypts were processed for isosurface rendering and 3D mark positioning (Fig. 2b). The strong actin signal at the apical adhesion belt was used to determine the long axis of the crypt over a short distance (typically 12  $\mu$ m) at the level of each mitotic figure. Next, a line Y linking the centre of the spindle axis, and crossing the crypt axis orthogonally was calculated. The alpha angle was calculated from the projection of the spindle and crypt axes on a plane oriented orthogonally to the Y line. The beta angle was calculated from the projection of the same axes on a 2<sup>nd</sup> plane perpendicular to the 1<sup>st</sup> one. All calculations were done with a custom written Matlab program.

### **Statistical analysis**

Data are the means expressed as mean value  $\pm$  standard deviation of the number of measurements. The statistical significance between experimental models was assessed by the unpaired Student's t test using R software, and  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant.

## References

1. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, et al. (2009) Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*.
2. Barker N, Wetering Mvd, Clevers H (2008) The intestinal stem cell. *Genes Dev* 22: 1856-1864.
3. Schneikert J, Behrens J (2006) The canonical Wnt signalling pathway and its APC partner in colon cancer development. *Gut*.
4. Pinto D, Clevers H (2005) Wnt, stem cells and cancer in the intestine. *Biol Cell* 97: 185-196.
5. Fodde R, Smits R, Hofland N, Kielman M, Khan PM (1999) Mechanisms of APC-driven tumorigenesis: lessons from mouse models. *Cytogenet Cell Genet* 86: 105-111.
6. Alrawi SJ, Schiff M, Carroll RE, Dayton M, Gibbs JF, et al. (2006) Aberrant crypt foci. *Anticancer Res* 26: 107-119.
7. McCartney BM, Nathke IS (2008) Cell regulation by the Apc protein Apc as master regulator of epithelia. *Curr Opin Cell Biol*.
8. Wong WM, Mandir N, Goodlad RA, Wong BC, Garcia SB, et al. (2002) Histogenesis of human colorectal adenomas and hyperplastic polyps: the role of cell proliferation and crypt fission. *Gut* 50: 212-217.
9. Tighe A, Johnson VL, Taylor SS (2004) Truncating APC mutations have dominant effects on proliferation, spindle checkpoint control, survival and chromosome stability. *J Cell Sci* 117: 6339-6353.
10. Green RA, Wollman R, Kaplan KB (2005) APC and EB1 Function Together in Mitosis to Regulate Spindle Dynamics and Chromosome Alignment. *Mol Biol Cell* 16: 4609-4622.
11. Draviam VM, Shapiro I, Aldridge B, Sorger PK (2006) Misorientation and reduced stretching of aligned sister kinetochores promote chromosome missegregation in EB1- or APC-depleted cells. *Embo J*.
12. Dikovskaya D, Schiffmann D, Newton IP, Oakley A, Kroboth K, et al. (2007) Loss of APC induces polyploidy as a result of a combination of defects in mitosis and apoptosis. *J Cell Biol* 176: 183-195.
13. McCartney BM, Price MH, Webb RL, Hayden MA, Holot LM, et al. (2006) Testing hypotheses for the functions of APC family proteins using null and truncation alleles in *Drosophila*. *Development* 133: 2407-2418.
14. McCartney BM, McEwen DG, Grevengoed E, Maddox P, Bejsovec A, et al. (2001) *Drosophila* APC2 and Armadillo participate in tethering mitotic spindles to cortical actin. *Nat Cell Biol* 3: 933-938.
15. Lu B, Roegiers F, Jan LY, Jan YN (2001) Adherens junctions inhibit asymmetric division in the *Drosophila* epithelium. *Nature* 409: 522-525.
16. Hamada F, Bienz M (2002) A *Drosophila* APC tumour suppressor homologue functions in cellular adhesion. *Nat Cell Biol* 4: 208-213.
17. Bienz M, Hamada F (2004) Adenomatous polyposis coli proteins and cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 16: 528-535.
18. Reinsch S, Karsenti E (1994) Orientation of spindle axis and distribution of plasma membrane proteins during cell division in polarized MDCKII cells. *J Cell Biol* 126: 1509-1526.
19. Fleming ES, Zajac M, Moschenross DM, Montrose DC, Rosenberg DW, et al. (2007) Planar Spindle Orientation and Asymmetric Cytokinesis in the Mouse Small Intestine.

- J Histochem Cytochem.
20. Thery M, Racine V, Pepin A, Piel M, Chen Y, et al. (2005) The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nat Cell Biol*.
  21. Toyoshima F, Matsumura S, Morimoto H, Mitsushima M, Nishida E (2007) PtdIns(3,4,5)P3 Regulates Spindle Orientation in Adherent Cells. *Dev Cell* 13: 796-811.
  22. Toyoshima F, Nishida E (2007) Spindle orientation in animal cell mitosis: roles of integrin in the control of spindle axis. *J Cell Physiol* 213: 407-411.
  23. Borgne RL, Bellaiche Y, Schweisguth F (2002) Drosophila E-cadherin regulates the orientation of asymmetric cell division in the sensory organ lineage. *Curr Biol* 12: 95-104.
  24. Kawasaki Y, Sato R, Akiyama T (2003) Mutated APC and Asef are involved in the migration of colorectal tumour cells. *Nat Cell Biol* 5: 211-215.
  25. Faux MC, Ross JL, Meeker C, Johns T, Ji H, et al. (2004) Restoration of full-length adenomatous polyposis coli (APC) protein in a colon cancer cell line enhances cell adhesion. *J Cell Sci* 117: 427-439.
  26. Carothers AM, K. A. Melstrom J, Mueller JD, Weyant MJ, Bertagnolli MM (2001) Progressive changes in adherens junction structure during intestinal adenoma formation in *Apc* mutant mice. *J Biol Chem* 276: 39094-39102.
  27. Busson S, Dujardin D, Moreau A, Dompierre J, Mey JRD (1998) Dynein and dynactin are localized to astral microtubules and at cortical sites in mitotic epithelial cells. *Curr Biol* 8: 541-544.
  28. Coquelle FM, Caspi M, Cordelieres FP, Dompierre JP, Dujardin DL, et al. (2002) LIS1, CLIP-170's Key to the Dynein/Dynactin Pathway. *Mol Cell Biol* 22: 3089-3102.
  29. Faulkner NE, Dujardin DL, Tai CY, Vaughan KT, O'Connell CB, et al. (2000) A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. *Nat Cell Biol* 2: 784-791.
  30. Yingling J, Youn YH, Darling D, Toyo-Oka K, Pramparo T, et al. (2008) Neuroepithelial Stem Cell Proliferation Requires LIS1 for Precise Spindle Orientation and Symmetric Division. *Cell* 132: 474-486.
  31. Yamanaka T, Ohno S (2008) Role of Lgl/Dlg/Scribble in the regulation of epithelial junction, polarity and growth. *Front Biosci* 13: 6693-6707.
  32. Potten CS, Roberts SA, Chwalinski S, Loeffler M, Paulus U (1988) Scoring mitotic activity in longitudinal sections of crypts of the small intestine. *Cell Tissue Kinet* 21: 231-246.
  33. Bjercknes M, Cheng H (1989) Mitotic orientation in three dimensions determined from multiple projections. *Biophys J* 55: 1011-1015.
  34. Lamprecht J, Zieba P, Strojny P (1986) Spatial orientation of the mitotic apparatus and its stability in a polarized epithelial cell. A computer-assisted morphometric analysis. *Anat Embryol (Berl)* 175: 129-135.
  35. Gong Y, Mo C, Fraser SE (2004) Planar cell polarity signalling controls cell division orientation during zebrafish gastrulation. *Nature* 430: 689-693.
  36. Strutt D (2005) Organ shape: controlling oriented cell division. *Curr Biol* 15: R758-759.
  37. Baena-Lopez LA, Baonza A, Garcia-Bellido A (2005) The orientation of cell divisions determines the shape of Drosophila organs. *Curr Biol* 15: 1640-1644.
  38. Fischer E, Legue E, Doyen A, Nato F, Nicolas JF, et al. (2006) Defective planar cell polarity in polycystic kidney disease. *Nat Genet* 38: 21-23.
  39. Matsuyama M, Aizawa S, Shimono A (2009) Sfrp controls apicobasal polarity and oriented cell division in developing gut epithelium. *PLoS Genet* 5: e1000427.
  40. Caldwell CM, Green RA, Kaplan KB (2007) APC mutations lead to cytokinetic failures in

- vitro and tetraploid genotypes in Min mice. *J Cell Biol* 178: 1109-1120.
41. Fleming ES, Temchin M, Wu Q, Maggio-Price L, Tirnauer JS (2009) Spindle misorientation in tumors from APC(min/+) mice. *Mol Carcinog*.
  42. Gomes JE, Corado M, Schweisguth F (2009) Van gogh and frizzled act redundantly in the *Drosophila* sensory organ precursor cell to orient its asymmetric division. *PLoS ONE* 4: e4485.
  43. Barker N, Es JHv, Kuipers J, Kujala P, Born Mvd, et al. (2007) Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature*.
  44. Colnot S, Niwa-Kawakita M, Hamard G, Godard C, Plenier SL, et al. (2004) Colorectal cancers in a new mouse model of familial adenomatous polyposis: influence of genetic and environmental modifiers. *Lab Invest* 84: 1619-1630.
  45. Smith KJ, Johnson KA, Bryan TM, Hill DE, Markowitz S, et al. (1993) The APC gene product in normal and tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 2846-2850.
  46. Green RA, Kaplan KB (2003) Chromosome instability in colorectal tumor cells is associated with defects in microtubule plus-end attachments caused by a dominant mutation in APC. *J Cell Biol* 163: 949-961.
  47. Anderson CB, Neufeld KL, White RL (2002) Subcellular distribution of Wnt pathway proteins in normal and neoplastic colon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 8683-8688.
  48. Hadjihannas MV, Bruckner M, Jerchow B, Birchmeier W, Dietmaier W, et al. (2006) Aberrant Wnt/ $\beta$ -catenin signaling can induce chromosomal instability in colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
  49. Dujardin D, Wacker UI, Moreau A, Schroer TA, Rickard JE, et al. (1998) Evidence for a role of CLIP-170 in the establishment of metaphase chromosome alignment. *J Cell Biol* 141: 849-862.
  50. Tibber MS, Kralj-Hans I, Savage J, Mobbs PG, Jeffery G (2004) The orientation and dynamics of cell division within the plane of the developing vertebrate retina. *Eur J Neurosci* 19: 497-504.
  51. Simons M, Walz G (2006) Polycystic kidney disease: Cell division without a c(1)ue? *Kidney Int*.
  52. Andreu P, Colnot S, Godard C, Gad S, Chafey P, et al. (2005) Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following *Apc* loss in the mouse intestine. *Development* 132: 1443-1451.
  53. Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B, Preisinger AC, Moser AR, et al. (1992) Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* 256: 668-670.
  54. Lawrence PA, Struhl G, Casal J (2007) Planar cell polarity: one or two pathways? *Nat Rev Genet* 8: 555-563.
  55. Benzing T, Walz G (2006) Cilium-generated signaling: a cellular GPS? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15: 245-249.
  56. Benzing T, Simons M, Walz G (2007) Wnt Signaling in Polycystic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*.
  57. Nurnberger J, Kribben A, Saez AO, Heusch G, Philipp T, et al. (2004) The *Invs* gene encodes a microtubule-associated protein. *J Am Soc Nephrol* 15: 1700-1710.
  58. Saburi S, Hester I, Fischer E, Pontoglio M, Eremina V, et al. (2008) Loss of *Fat4* disrupts PCP signaling and oriented cell division and leads to cystic kidney disease. *Nat Genet* 40: 1010-1015.
  59. Schlessinger K, McManus EJ, Hall A (2007) *Cdc42* and noncanonical Wnt signal transduction pathways cooperate to promote cell polarity. *J Cell Biol*.
  60. Golan T, Yaniv A, Bafico A, Liu G, Gazit A (2004) The human *Frizzled 6* (*HFz6*) acts as a negative regulator of the canonical Wnt.  $\beta$ -catenin signaling cascade. *J Biol Chem*

279: 14879-14888.

61. Karner C, Wharton KA, Jr., Carroll TJ (2006) Planar cell polarity and vertebrate organogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 17: 194-203.
62. Becker L, Huang Q, Mashimo H (2008) Immunostaining of Lgr5, an intestinal stem cell marker, in normal and premalignant human gastrointestinal tissue. *ScientificWorldJournal* 8: 1168-1176.
63. Boman BM, Huang E (2008) Human colon cancer stem cells: a new paradigm in gastrointestinal oncology. *J Clin Oncol* 26: 2828-2838.

**Acknowledgements** This work is part of the thesis work of J.B. for obtaining the Ph.D. degree of the Université de Strasbourg (formerly Université Louis Pasteur). J.B. was supported by grants from the Ligue contre le Cancer. We thank J. Dompierre for establishing the EB1-GFP expressing MDCK II cell line, P. Hery (CEA Saclay, France) for providing the APC<sup>+/min</sup> mice, the members of the imaging facilities of the CRBM (Pierre Travo, Montpellier) and the IGBMC (J.-L. Vonnesh, P. Kessler, Illkirch). We are grateful to M. Labouesse and M. Piel for discussion and critical reading of the manuscript.

**Competing interests statement** The authors declare that they have no competing financial interests.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.D.M. (demey@unistra.fr.)

## Figure legends

**Figure 1** SW480-APC cells display more  $\alpha$ -catenin at the cell membrane and a more continuous ZO1 labelling, and display improved kinetochore microtubule attachment. **a**,  $\alpha$ -catenin and ZO-1 distribution in SW480 and SW480-APC cells. Colour overlays of maximal intensity projections of image stacks are shown. ZO1 is more continuous in SW-480 cells, indicating the formation of tight junctions. **b**, Colour overlays of optical sections of metaphase cells labelled with DAPI (blue), CREST (red, centrosome region) and CLIP-170 (green, a +TIP microtubule associated protein). CLIP-170 is known to leave the kinetochore only when it is well attached to spindle microtubules. CLIP signals remain present in SW480 cells, and are undetectable in SW480-APC cells. **c**, The distribution of angles between spindle long axis (determined by the CLIP-170 labelling at the spindle poles, not visible here) and individual centromere doublets (labelled by CREST antibodies, see Supplementary Methods for details). Kinetochores in SW480-APC are significantly better aligned than in SW480.

**Figure 2** Analysis of parameters of spindle behaviour in individual cells, and in a population of 100 cells. Spindle behaviour in an MDCK cell expressing EB1-GFP and stained by vital Hoechst is shown: **a**, A cell displaying a significant angular displacement during metaphase (time in minutes). **b**, Feature extraction (cell and chromatin contour) and computation of chromosome long and short axes. **c**, Time diagrams of the values for the ratio between metaphase plate long and short axis, intercentroid distance, angle  $\Omega$ , and the accumulated angle  $\Omega$  (see Supplementary Methods and Supplementary Data II above for details). In this cell, the rotational reorientation occurring between 10' and 14' is clearly visible in the analysis of angle  $\Omega$  (c3), the spindle turning over an angle of  $90^\circ$  during that time. A transient reorientation occurring between 8' and 10' can also be seen. Colour code: violet: prophase; cyan: prometaphase; green: metaphase; red: anaphase; black: cytokinesis. Time point 16 is the onset of anaphase. **d**, Example of the computation of the mean frequency values for a parameter of spindle behaviour in a population of 100 cells: for each parameter (here angle  $\Omega$ ), frequency diagrams of individual cells are assembled into one plot, from which the mean frequency values are computed. **e**, The mean frequency diagram for angle  $\Omega$  in a population of 100 MDCK cells.

**Figure 3** The basis for computing 5 parameters of spindle behaviour. See Supplemental Methods for explanations.

**Figure 4** Comparison of 5 parameters of spindle behaviour in SW480, SW480-APC and MDCK cells. See Supplementary Data II for explanations.

**Figure 5** Image analysis of division orientation in intact colon crypts of wild type mice.

**a**, Intact crypts labelled for gamma tubulin (red), F-actin (green) and DNA (blue). The apical pole of cells viewed “en face” (arrow) shows a regular polygonal aspect. Mitotic cells (arrows) have retracted away from the basal lamina and are positioned near the luminal side of the crypt. **b**, Iso-surface rendering delineates the internal part of the crypt, and three spindles. The axes used for angle measurements in orange for the mitotic cell and yellow for the crypt axis. **c, c'** and **d, d'**, Spindles oriented and non-oriented longitudinally. **c,d** are planes of the same stacks taken at the level of the crypt lumen and **c',d'** planes at the spindle poles. **e, e'**, 3D diagram of a spindle in a crypt. Plane 1 is obtained by looking along a line passing through the centre of the spindle and crossing the crypt axis (red) orthogonally. The projection of the crypt and spindle axes on plane 1 yields angle alpha. The same on plane 2 yields angle beta. **e''**, The left and right panels indicate the consequences of extremes for respectively angle alpha and beta. Large alpha angles contribute to crypt thickening, and large beta angles lead to delamination of one daughter cell. **f, g**, Alpha and beta angle measurements on 67 mitotic cells in intact colon crypts of wild type mice. **f', g'**, cumulated percentages. 80 % of alpha angles are below 30°, but a small percentage display angles approaching up to 90°. Nearly 100% of beta angles are < 20°.

**Figure 6** Sudden loss of *Apc* in floxed-*Apc* x *Villin-CreERT2* mice treated with tamoxifen and sporadic LOH in ACF of *Apc*<sup>Δ14/+</sup> mice, lead to enlarged crypts, perturb the apico-lateral actin-rich belts and increase cell proliferation. **a, b, c**, Organisation of the apico-basal actin-rich belts shows regularly shaped crypts, crypt lumen and apical belts in wt (**a**), but perturbed architecture and disorganised apical belts and enlarged crypts in floxed-*Apc* x *Villin-CreERT2* mice treated with tamoxifen (**b**) and in ACF from *Apc*<sup>Δ14/+</sup> mice (**c**). Bar = 20 μm. **d**, iso-surface rendering of ACF from *Apc*<sup>Δ14/+</sup> mice shows 9 mitotic cells, illustrating the high proliferation rate.

**Figure 7** Normal OCD in crypts from  $Apc^{1638N/+}$ ,  $Apc^{Min/+}$  and  $Apc^{\Delta14/+}$  mice, but perturbation upon sudden loss of  $Apc$  in crypts of floxed- $Apc$  x  $Villin-CreERT2$  mice treated with tamoxifen, isolated 5 days after tamoxifen administration, and upon LOH in ACF of  $Apc^{\Delta14/+}$  mice. **a, b**, The values of alpha and beta angles for colon crypts of  $Apc^{1638N/+}$  (n=52),  $Apc^{\Delta14/+}$  (n=45) and  $Apc^{Min/+}$  (n=47) mice, for small intestine crypts of  $Apc^{Min/+}$  (n=45) and colon ACF of  $Apc^{\Delta14/+}$  (n=47) mice, and for colon crypts of floxed- $Apc$  x  $Villin-CreERT2$  mice treated with tamoxifen (n=17). **c, e**, Frequency bars, and **d, f**, cumulative percentages. The data show perturbation in both orientations in crypts of floxed- $Apc$  x  $Villin-CreERT2$  mice treated with tamoxifen, normal values in  $Apc^{1638N/+}$ ,  $Apc^{Min/+}$  and  $Apc^{\Delta14/+}$  mice (small intestine and colon) models, and significant perturbation of the longitudinal alignment, but normal planar alignment in ACF of  $Apc^{\Delta14/+}$  mice.

# Figures

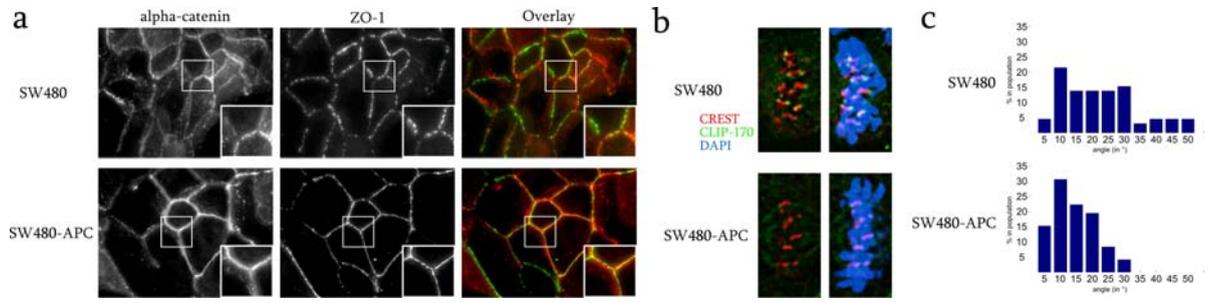


Fig. 1

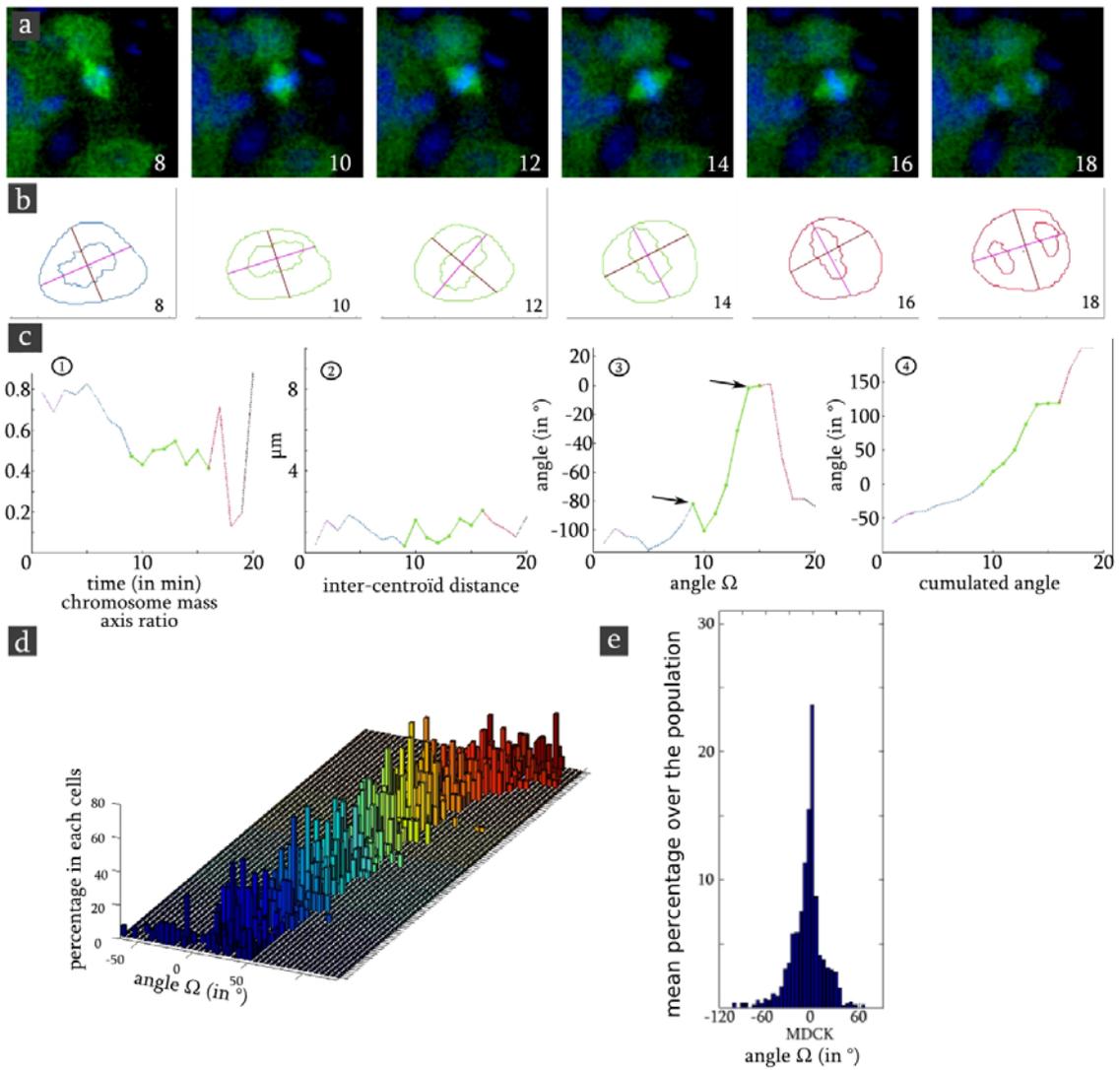


Fig. 2

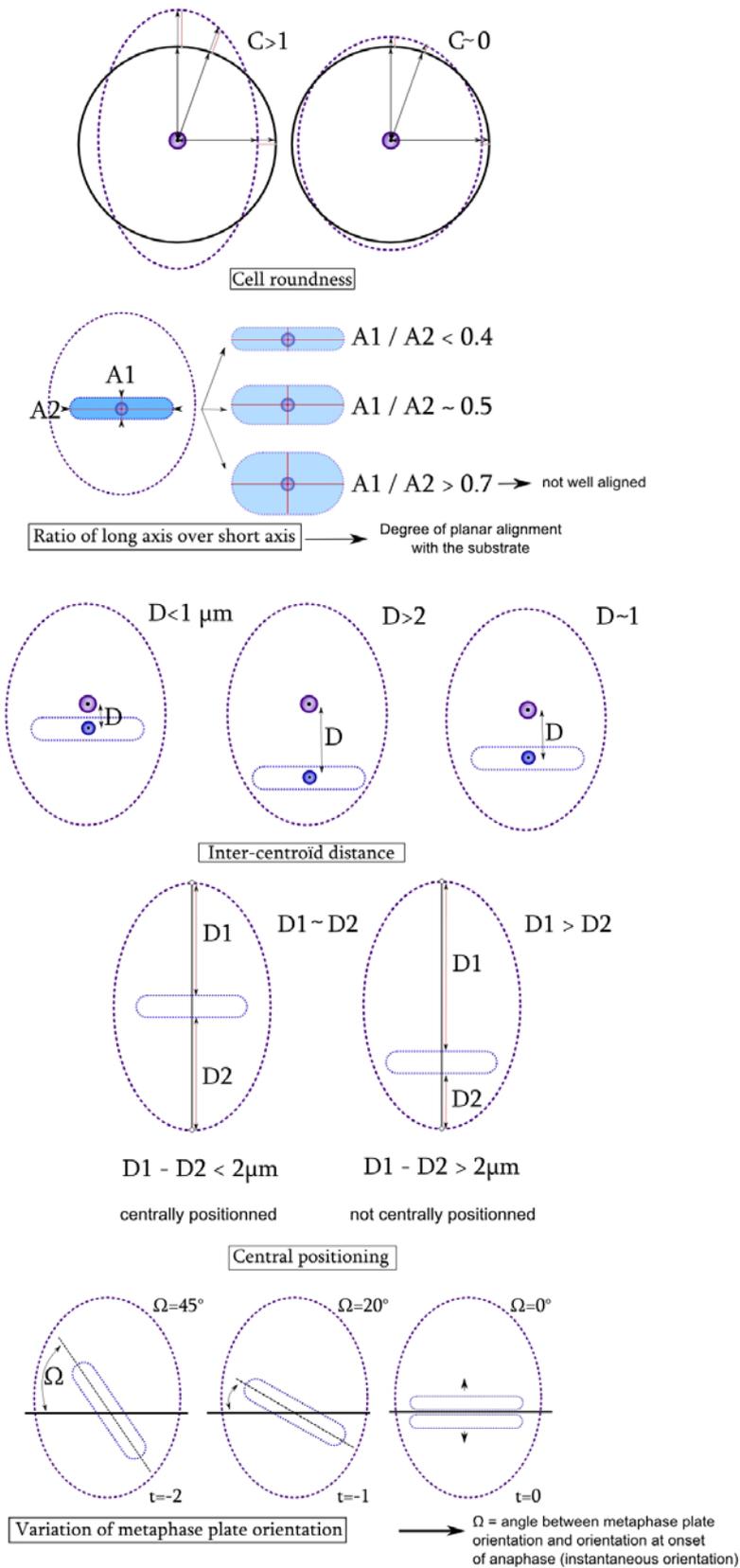


Fig. 3

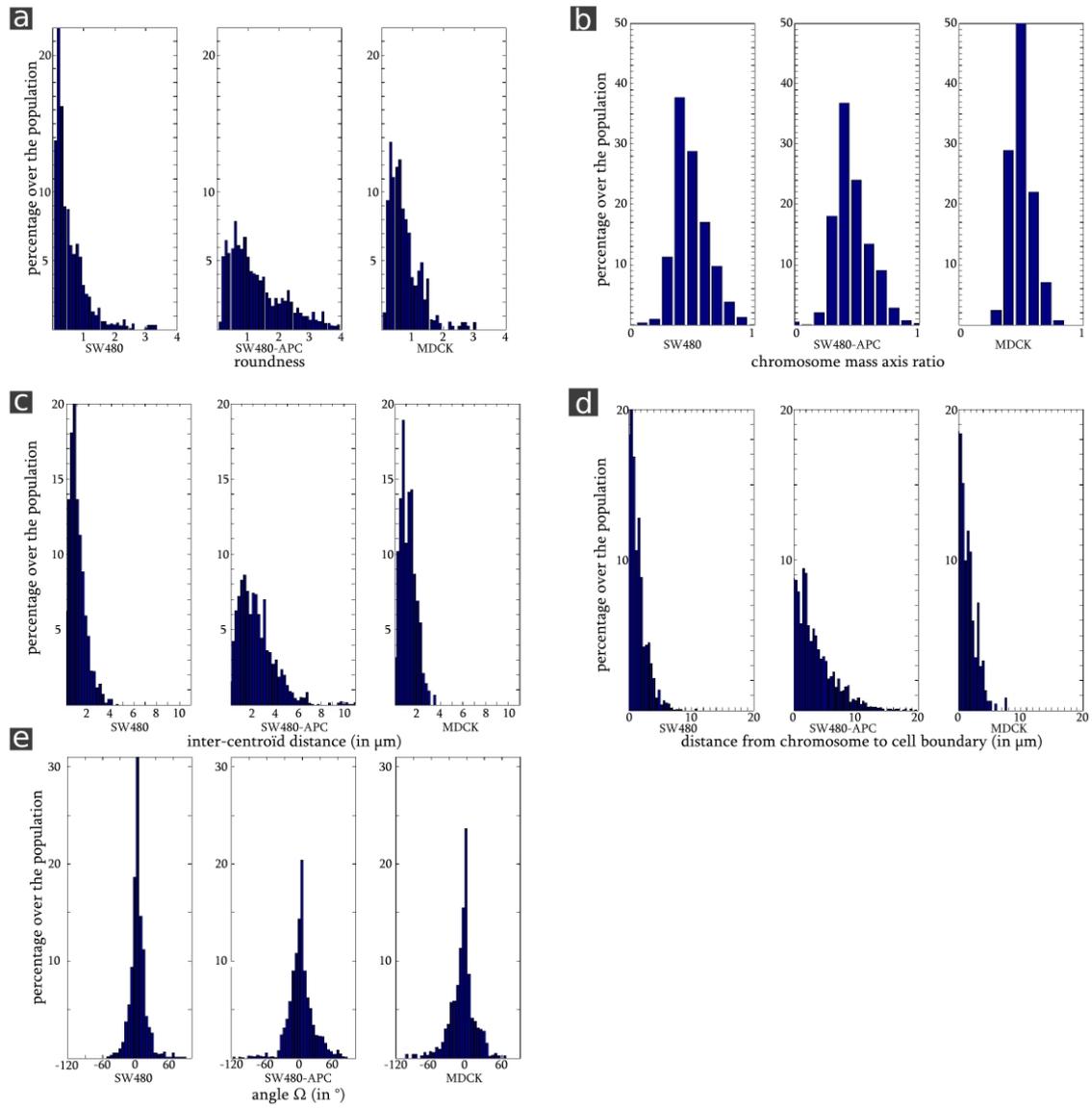


Fig. 4

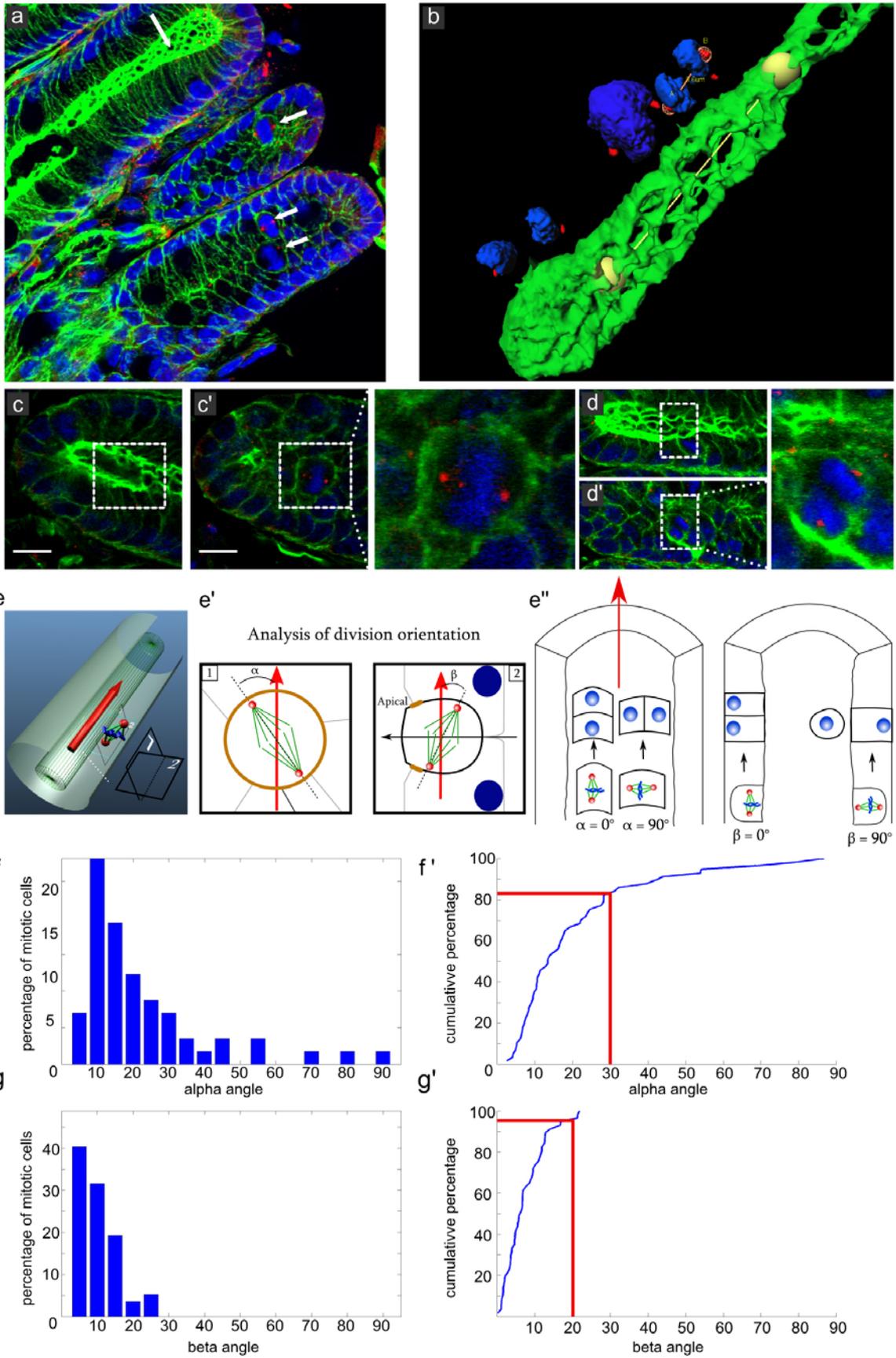


Figure 5

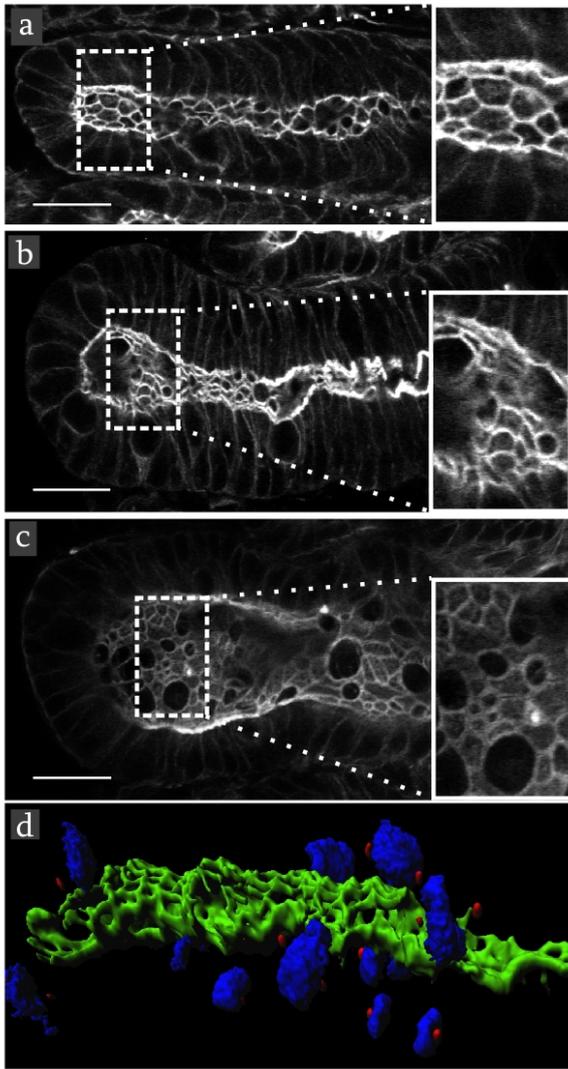


Figure 6

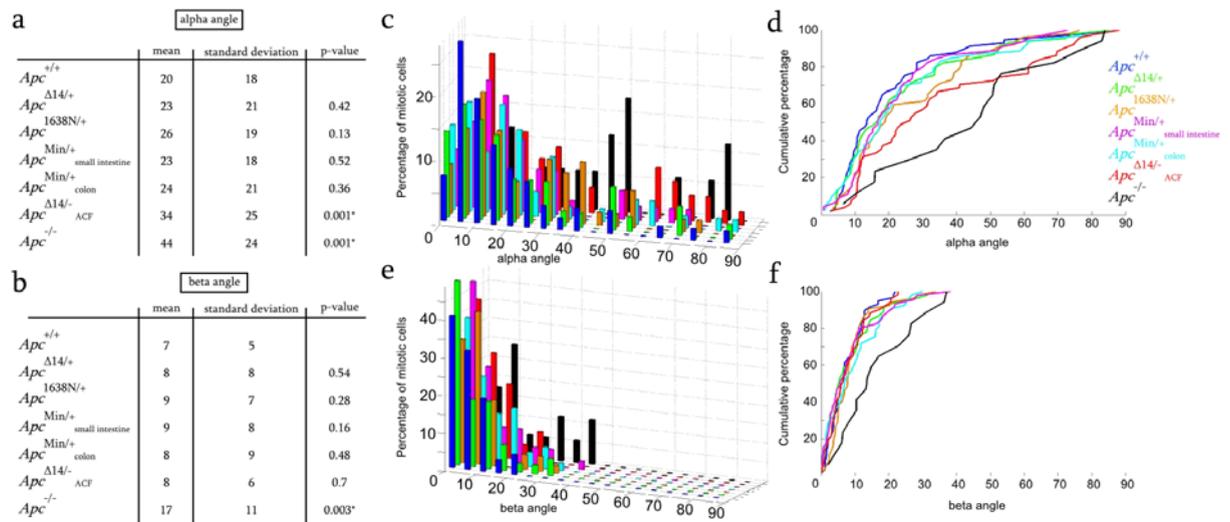
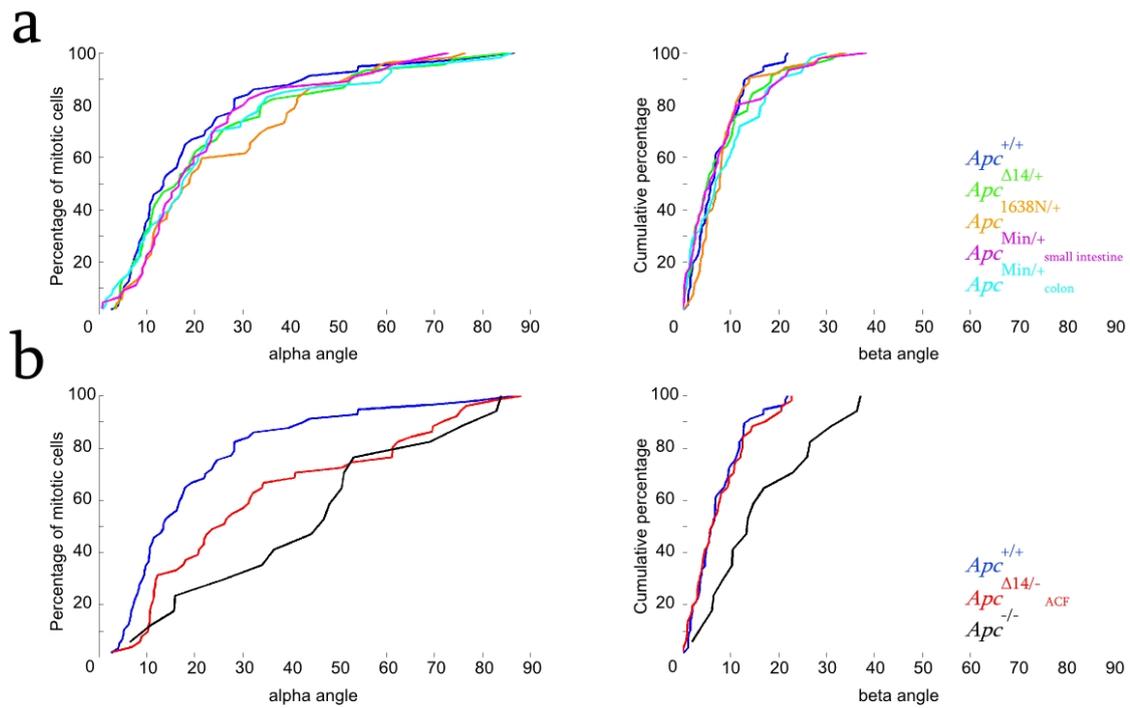


Figure 7

## Supplementary Figure



**Figure S1** Alpha and beta angles in crypts of the mice models used. **a**, Cumulated values of alpha and beta angles in normal crypts for the indicated mice models. **b**, Cumulated values of alpha and beta angles in crypts of floxed-*Apc* x *Villin-CreERT2* and in ACF of *Apc*<sup>Δ14/+</sup> mice.

# Traitement des cellules par ARN interférent contre la protéine CLIP-170 pour tester les fonctions de la Dyneïne

Dans le but d'étudier l'implication possible de CLIP-170 dans le recrutement du complexe Dyneïne/Dynactine au cortex et le positionnement du fuseau mitotique nous avons entrepris une étude phénotypique de diminution du taux de la protéine CLIP-170 par ARN interférent. Par manque de temps je n'ai pas pu appliquer mon programme de mesure du comportement du fuseau mitotique aux cellules traitées. Néanmoins j'ai pu en encadrant une étudiante en master, Awa Deme, qui a réalisée son stage au sein du laboratoire procéder à une analyse phénotypique simplifiée. Nous avons ainsi pu tester le rôle de CLIP-170 dans l'adressage de la Dynactine et de NuMA au cortex latéral de cellules mitotiques et le rôle de cette protéine ainsi que du complexe moteur Dyneïne/Dynactine dans le processus d'alignement et d'orientation du fuseau.

## Matériels et Méthodes

**ARN interférent** Les duplexes siRNA CLIP-170 1 (Watson & Stephens, 2006), CLIP-170 2 (Tanenbaum *et al.*, 2006) ainsi que CLIP-170 Scramble ont été synthétisés par Invitrogen (cf tableau ci-dessous).

Nom de la séquence	composition
CLIP-170 1	GAA GGC UAG AGU CCA AUA A
CLIP-170 2	GCA CAG CTC TGA AGA CAC C
CLIP-170 Scramble	GGU ACU UAG GAG AAC CAA ATT

Les siRNA ont été utilisés à une concentration finale de 100 nM. Les cellules sont ensemencées à  $7.10^4$  cellules/puit en plaques 12 puits dans du milieu sans antibiotique (milieu RPMI, glutamine, sérum et insuline) et transfectées après 48h par la méthode oligofectamine (Invitrogen). Parallèlement des lamelles contrôles sont réalisées : sans siRNA, avec oligofectamine seul, siCLIP170 1 à 100nM sans oligofectamine. Pour les expériences d'immunomarquage à chaque 48h, 72h et 96h d'incubation (et pour les 6 conditions de transfection) les lamelles sont prélevées et une étape de prélyse (PHEM-Triton 0,5% pendant 30 secondes) est réalisée avant la fixation Paraformaldéhyde 3% (PHEM 1x et Triton-X100 0,1%) pendant 20 min sous agitation. Après 3 bains de PBS, les lamelles sont stockées à 4°C dans du PBS. Les lamelles sont ensuite marquées en même temps pour satisfaire aux conditions requises pour l'acquisition 3D et la déconvolution. Les anticorps primaires anti-CLIP-170 (polyclonal lapin) et anti-p150<sup>Glued</sup> (monoclonal souris) sont utilisés au 1/200<sup>me</sup>. Les anticorps secondaires sont : anti-rabbit AlexaVert-488, et anti-mouse

Cy5. L'actine est marquée par de la Phalloïdine-Rhodamine et l'ADN au DAPI. Pour les expériences de microscopie time-lapse les lamelles sont prélevées de la même façon que précédemment. Après marquage au Hoechst pendant 30 minutes les cellules sont filmées pendant 20 heures. Les acquisitions ont été faites chaque 3 minutes en contraste de phase et en Hoechst sur 20 champs. Après chaque time-lapse les lamelles sont fixées afin de confirmer la diminution de CLIP-170 dans les cellules transfectées.

**Western blotting** Les cellules sont lavées dans du PBS froid, puis lysées dans un tampon d'extraction RIPA (150mM NaCl, 50mM Tris pH=8, 0.1% TritonX100) contenant une solution d'inhibiteur de protéase (Complete Mini EDTA free). Les lysats sont récupérés par centrifugation (13000g, 10min à 4°C), mélangés à un tampon bleu Laemmli (Tris 0,5M pH=6,8, SDS 20% Glycérol,  $\beta$ -mercaptoethanol, H<sub>2</sub>O, quelques grains de bromophénol) puis dénaturés à 100 °C pendant 3min. Les protéines sont ensuite séparées sur un gel d'électrophorèse dénaturant (SDS-PAGE) pendant 1h (110V) dans du tampon de migration Tank Buffer (0,025M Tris, 0,192M Glycine, 0,1% SDS pH 8,3). Après migration les protéines sont transférées sur une membrane Immobilon-P (Millipore). La membrane est préalablement trempée dans du méthanol avant d'être rincée à l'eau et équilibrée dans du tampon de transfert (0,025M Tris ; 0,192M Glycine ; 0,1%SDS pH 8,3 ; 10% méthanol). Le gel de polyacrylamide est également équilibré dans le tampon de transfert avant d'être mis au contact de la membrane. Le transfert s'effectue sur la nuit (12V, 1mA). La membrane est ensuite incubée pendant 1h à température ambiante et sous agitation avec un tampon de blocage (PBS, 5% lait, 0,1% Tween20) afin de saturer les sites non spécifiques. Après avoir éliminé le tampon de blocage la membrane est incubée en présence de l'anticorps primaire (anti-CLIP170 H<sub>1</sub>B), dilué dans le tampon de blocage, pendant une heure. Après incubation, la membrane est lavée dans du PBS-Tween 0,1% avant d'être incubée avec l'anticorps secondaire Hrp-anti-lapin pendant 1h. Les membranes sont ensuite lavées dans du PBS-Tween 0,1% afin d'éliminer l'excès d'anticorps secondaire. La révélation est réalisée par une réaction de chimiluminescence en utilisant le système ECL (ECL Western Blotting Detection Reagent). Le poids moléculaire de notre protéine spécifique est déterminé par comparaison avec la migration des marqueurs de taille connu (Prestained Protein Ladder).

## Résultats

Une première série d'expériences a été réalisée dans le but de déterminer la durée optimale de traitement pour obtenir une diminution maximale du taux de la protéine CLIP-170, de comparer les deux séquences et enfin de s'assurer de la spécificité du traitement par comparaison avec la séquence Scramble. Les cellules ont été fixées après 48, 72 et 96h post-transfection. Elles ont ensuite été marquées par immunofluorescence pour CLIP-170 et p150<sup>Glued</sup>. Chaque condition a été dupliquée. On n'observe pas de différences

notables entre les cellules non traitées et les contrôles de l'expérience siRNA (cellules traitées par l'Oligofectamine seule ou par les séquences sans Oligofectamine). Il sera nécessaire de confirmer l'absence d'effet sur la culture par comptage du nombre de mitoses et des phases mitotiques. Les lames ont permis de documenter plusieurs aspects qui permettent de valider l'approche. Dans les cellules traitées par la séquence siRNA 2, on observe une diminution effective du niveau de CLIP170 par Western Blot après 72 heures de transfection (cf figure 3.1). À partir de 72h post-transfection, le signal de l'immunomarquage de CLIP-170 dans le cytoplasme est fortement atténué dans un grand nombre de cellules. On note une forte diminution du marquage correspondant aux extrémités  $\oplus$  des microtubules. Comme attendu, cela entraîne une délocalisation de p150<sup>Glued</sup> dans le cytoplasme. On observe cependant dans plusieurs cellules des extrémités  $\oplus$  de microtubules marquées finement, indiquant une variabilité dans l'efficacité de diminution de CLIP-170. Ceci n'est pas surprenant car il est connu qu'il faut réprimer la CLIP-170 très fortement pour éliminer cette localisation. La CLIP-170 a en effet une forte affinité pour ces structures.

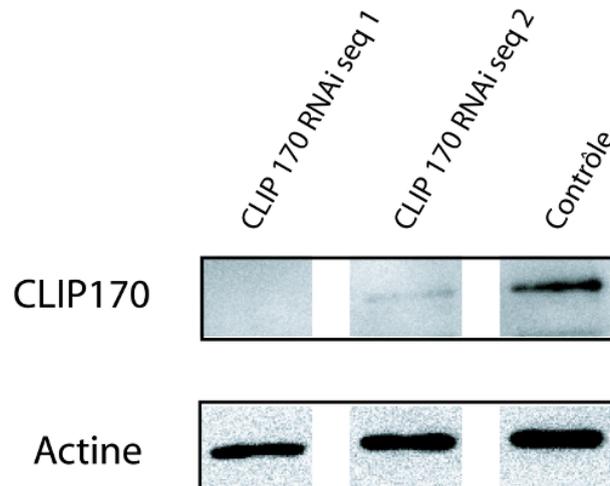


FIGURE 3.1 – Western blotting montrant la diminution de CLIP-170 72h après traitement par ARN interférent

La même quantité de lysat a été chargée dans les puits. La membrane a été coupée pour révéler à la fois l'actine et CLIP-170.

Dans les cellules mitotiques SW480-APC traitées par la séquence 2 (figure 3.2 page suivante), on observe dans une majorité des cellules, une diminution nette du niveau global de CLIP170 avec une forte diminution de CLIP-170 au cortex et aux kinétochores. Le marquage non spécifique des chromosomes et du centriole lié à un problème de spécificité de l'anticorps employé est mieux visible, mais ne gêne pas la lecture. Ces expériences devront être reproduites à l'aide de meilleurs anticorps anti-CLIP-170. Le marquage de p150<sup>Glued</sup> est comparable aux cellules non traitées, et donc intense, au niveau des pôles du fuseau et au niveau des kinétochores libres. De façon intéressante il est fortement diminué au cortex quand CLIP-170 est également fortement réprimée. Il reste présent au cortex dans des cellules où on observe également une présence de CLIP-170, même légère

(figure 3.2). Dans la population de cellules mitotiques, la plupart des figures mitotiques semblent normales, mais dans environ 15% de cellules, les chromosomes paraissent mal alignés au niveau de l'équateur, et dans environ 5% des cellules, les chromosomes ne sont pas du tout alignés. La séquence siRNA 1 a donné des résultats comparables quant à l'effet sur la détection et les localisations de CLIP-170 et p150<sup>Glued</sup>, avec toutefois un effet moins profond. Ces observations indiquent que nous avons obtenu une diminution correcte de CLIP-170.

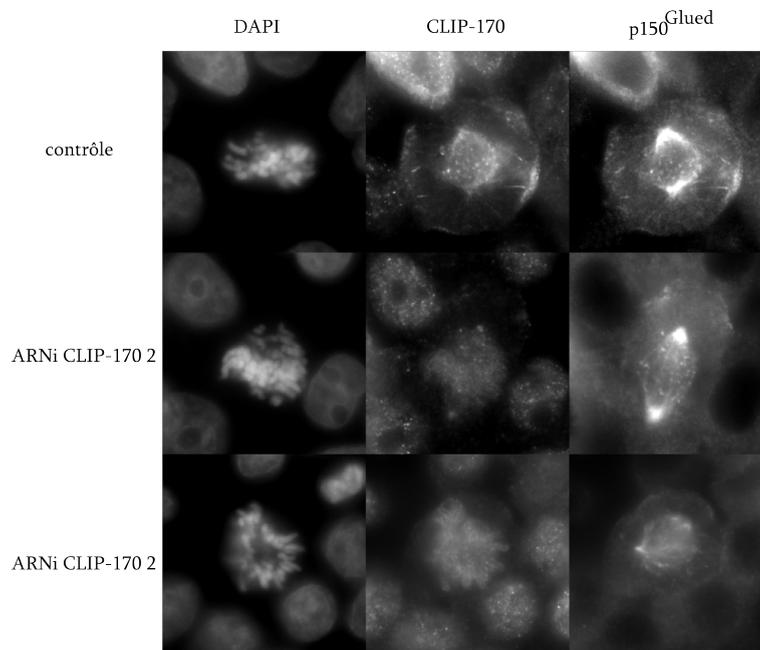


FIGURE 3.2 – Immunofluorescence montrant la diminution de CLIP-170 après traitement par ARN interférent

L'immunomarquage de cellules SW480-APC mitotiques révèle la présence de CLIP-170 et p150<sup>Glued</sup> sur les microtubules astériens et au cortex. La diminution de CLIP-170 fait apparaître le marquage non spécifique de l'anticorps utilisé (les chromosomes et les centrosomes, voir les lignes ARNi CLIP-170 2 de la figure). Le marquage des kinétochores est très fortement diminué (comparer le marquage CLIP-170 de la cellule du milieu pour les kinétochores avec la même cellule immunomarkuée pour p150<sup>Glued</sup>). De plus la présence de p150<sup>Glued</sup> au cortex est fortement diminuée, et est présente uniquement aux endroits où l'on peut apercevoir des traces de CLIP-170.

**Etude du comportement du fuseau dans des cellules traitées à l'ARN interférent contre CLIP-170** Afin de comprendre le rôle de CLIP-170 dans l'alignement et l'orientation du fuseau, et dans l'adressage de la Dynactine au cortex, nous avons réalisé une étude en time-lapse multipositionnement du comportement du fuseau. En dépit de la résolution spatiale peu élevée imposée par les contraintes techniques, plusieurs mesures/observations peuvent être effectuées :

1. la durée de la mitose définie comme le laps de temps entre la rupture de l'enveloppe nucléaire et l'entrée en anaphase

2. la qualité de la migration des chromosomes vers l'équateur du fuseau
3. la réorientation du fuseau au cours de la mitose
4. la conservation de l'alignement planaire au cours de la mitose
5. le déroulement de la cytokinèse
6. la fréquence d'évènements d'aneuploïdie
7. la présence de cellules apoptotiques

Pour répondre à la question de la réorientation deux lignes sont tracées le long de la plaque des chromosomes à la fin de la prométaphase et juste avant l'entrée en anaphase. L'angle entre ces deux positions est une mesure de la réorientation. Pour la question de l'alignement planaire la plaque métaphasique est observée au cours de la mitose. Lorsqu'on observe une variation de la largeur suite à une inclinaison du fuseau la cellule est considérée comme subissant un mouvement de pendule de la plaque métaphasique. La présence de ce type de mouvements indique qu'il y a eu une perturbation du mécanisme d'alignement planaire du fuseau. Pour chaque paramètre on détermine le % de cellules affectées. Les paramètres normaux dans des cellules confluentes non traitées ont été déterminés. Une série d'expériences time-lapse a été effectuée sur chacune des deux lignées SW480-Vector et SW480-APC non traitées. Cinquante cellules mitotiques ont ensuite été analysées par lignée. Aucun phénomène d'aneuploïdie ou de problème de cytokinèse n'a été observé dans cet échantillon.

Dans un second temps, nous avons analysé ces paramètres sur les deux lignées 72h après transfection avec la séquence 2 siRNA dirigée contre CLIP-170 . L'analyse a été effectuée sur 100 cellules mitotiques sur chacun de nos clones SW480. Nous avons constaté dans les deux lignées que plus de 90% des cellules mitotiques arrivent à assembler un fuseau et à terminer leur mitose malgré la diminution effective de CLIP-170.

Dans la lignée SW480-Vector, 3% des cellules font une apoptose après avoir assemblé leur plaque métaphasique. Nous avons exclu de notre analyse ces cellules ainsi que les cellules qui ne terminent pas leur mitose. La durée moyenne des mitoses est de  $39 \pm 21$  min (n=93). Seul 32% des cellules ont une mitose de moins de 30 min, 56% durent entre 30 et 60 min, et 12 % entre 60 et 150 min. 27% des cellules effectuent une réorientation de leur plaque au-delà de  $30^\circ$ , dont 1/3 au-delà de  $45^\circ$ . (figure 3.3 page suivante, D et E).

Dans les SW480-APC, 12% de cellules font une apoptose après avoir assemblé leur plaque métaphasique. La durée moyenne des mitoses est de  $40 \text{ min} \pm 21 \text{ min}$  (n=85). 33% des cellules ont des mitoses qui durent moins de 30 min, 55% durent entre 30 et 60 min, et 12 % entre 60 et 150 min. 23% des cellules effectuent une réorientation de leur plaque au delà de  $30^\circ$ , dont la moitié au-delà de  $45^\circ$ . (figure 3.3 page suivante, F et G).

Dans la majorité des mitoses plus longues que 30 minutes, nous avons observé et ce dans les deux lignées, des chromosomes qui peinent à s'aligner à l'équateur (figure 3.3 page suivante,I). Enfin, nous avons mis à profit notre observation d'un phénomène de pendule dans les cellules traitées (figure 3.3 page précédente, H) et non traitées (figure 3.3

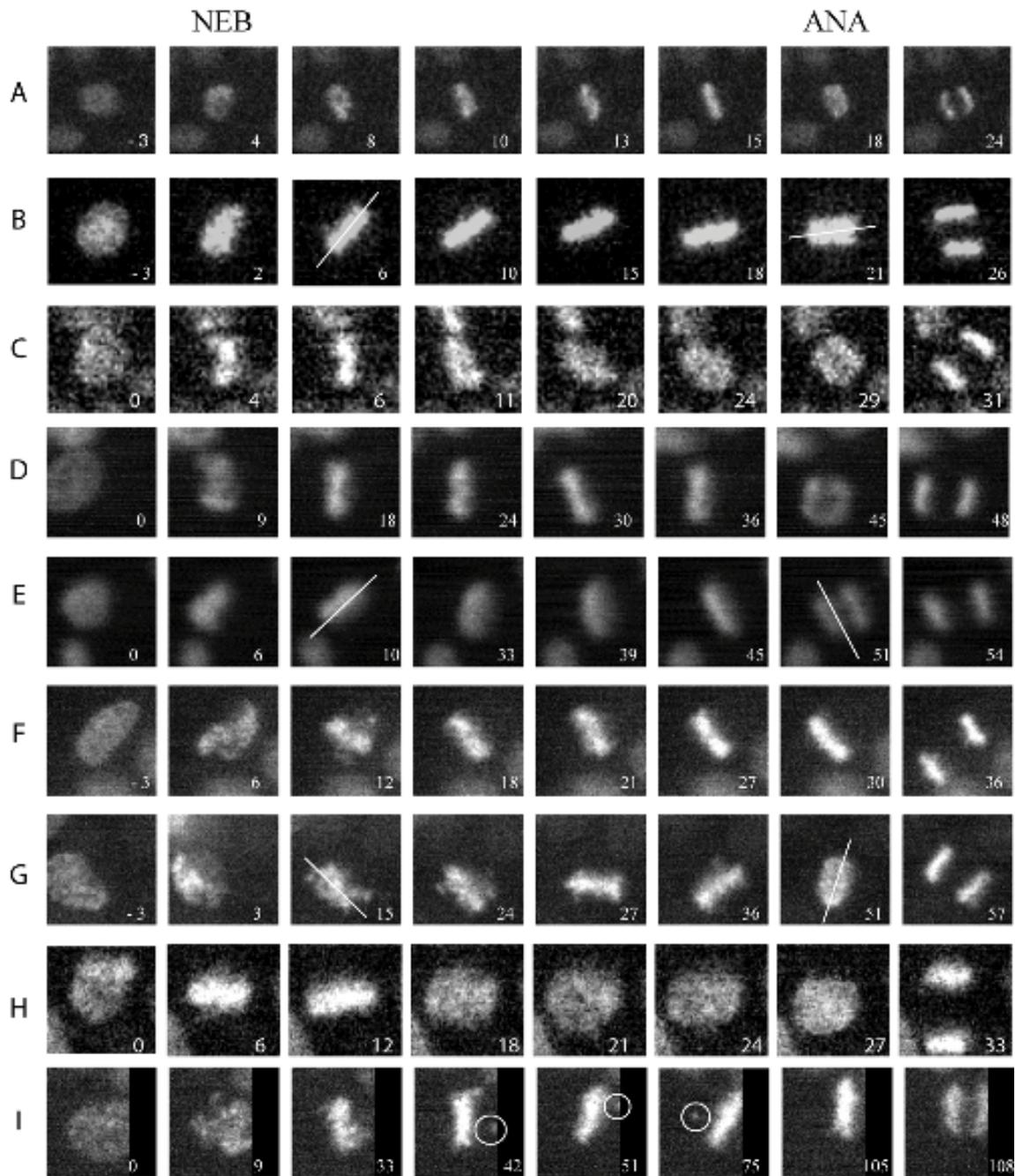


FIGURE 3.3 – Conséquence de la diminution de CLIP-170 par ARN interférent sur le comportement du fuseau et la congruence des chromosomes

Images extraites de différentes acquisitions sur les SW480 Vector et APC, traitée par ARN interférent ou non. A : SW480 Vector non traitée, sans réorientation ; B : SW480 APC non traitée, avec réorientation (comparer les deux traits, l'un en métaphase et l'autre en début d'anaphase) ; C : SW480 APC, contrôle, avec bascule ; D : SW480 Vector traitée ARN interférent contre CLIP170, sans réorientation ; E : SW480 Vector traitée ARN interférent contre CLIP170, avec réorientation ; F : SW480 APC traitée ARN interférent contre CLIP170, sans réorientation ; G : SW480 APC traitée ARN interférent contre CLIP170, avec réorientation ; H : SW480 APC traitée ARN interférent contre CLIP170, avec bascule ; I : SW480 APC traitée ARN interférent contre CLIP170, avec problème de congruence de chromosome (dans les ronds blancs)

page précédente, C) pour évaluer l'impact de la diminution de CLIP-170 sur ce phénomène. Nous avons observé chaque cellule individuelle et donné une note pour qualifier le fuseau soit comme aligné de façon stable avec le substrat, effectuant un mouvement de pendule, ou non interprétable. Nous avons ensuite combiné ces observations avec les deux autres paramètres importants : la durée de la mitose et la réorientation du fuseau entre métaphase et le début de l'anaphase (figure 3.4 page suivante). Ceci nous a permis d'évaluer le nombre de cellules subissant un mouvement de pendule, et de chercher des corrélations avec la réorientation et la durée de mitose. Dans les deux lignées non traitées, le mouvement de pendule est présent dans respectivement 15 % (Vector) et 20 % (APC) des cellules. On ne constate aucune corrélation avec celui de la réorientation. Par contre, dans les SW480-APC, ce mouvement de pendule est plus présent dans les cellules qui font une mitose durant plus de 30 minutes. Dans les deux lignées traitées par ARN interférent, le nombre de cellules avec des fuseaux effectuant un mouvement de pendule est en nette augmentation : 35 % et 40% dans les SW480 et les SW480-APC respectivement. Comme pour les cellules non traitées, il n'y a aucune corrélation avec le phénomène de réorientation. Le mouvement de pendule est déjà présent dans 50% des cellules dont la mitose dure entre 30 et 60 minutes, et est quasiment général dans les cellules faisant une mitose encore plus longue. D'autres expériences, et notamment avec la séquence Scramble devront être réalisées.

## Discussion

**La technique d'ARN interférent appliquée à la voie fonctionnelle de la Dynéine** Avec l'aide des techniques actuelles d'inactivation fonctionnelle (microinjection d'anticorps ou de protéines recombinantes, surexpression, siRNA, cellules dérivées d'animaux -/- transgéniques) pourtant très puissantes, il est quasiment impossible d'étudier le rôle de la Dynéine dans un processus comme l'orientation et l'alignement du fuseau. Le moteur est impliqué simultanément dans un grand nombre de processus interdépendants, et son inactivation entraîne de nombreux phénotypes superposés. Il a été montré par exemple, qu'en utilisant un anticorps dirigé contre la Dynéine on affecte de façon drastique le fuseau mitotique qui perd par conséquent un de ces pôles après le détachement d'un centrosome du fuseau (Vaisberg *et al.*, 1993). Denis Dujardin dirige des travaux visant à explorer la technique micro-FALI, qui permet d'inactiver des protéines étiquetées génétiquement par une molécule fluorescentes. La technique d'ARN interférent peut toutefois donner des résultats très intéressants lorsque l'on cible une protéine qui est moins multifonctionnelle. Ce pourrait être le cas de CLIP-170, qui se co-localise avec la protéine LIS1 et le complexe Dyneine/Dynactine au cortex de la cellule, mais n'est pas impliquée dans la stabilité de la région polaire du fuseau (Dujardin *et al.*, 1998; Coquelle *et al.*, 2002).

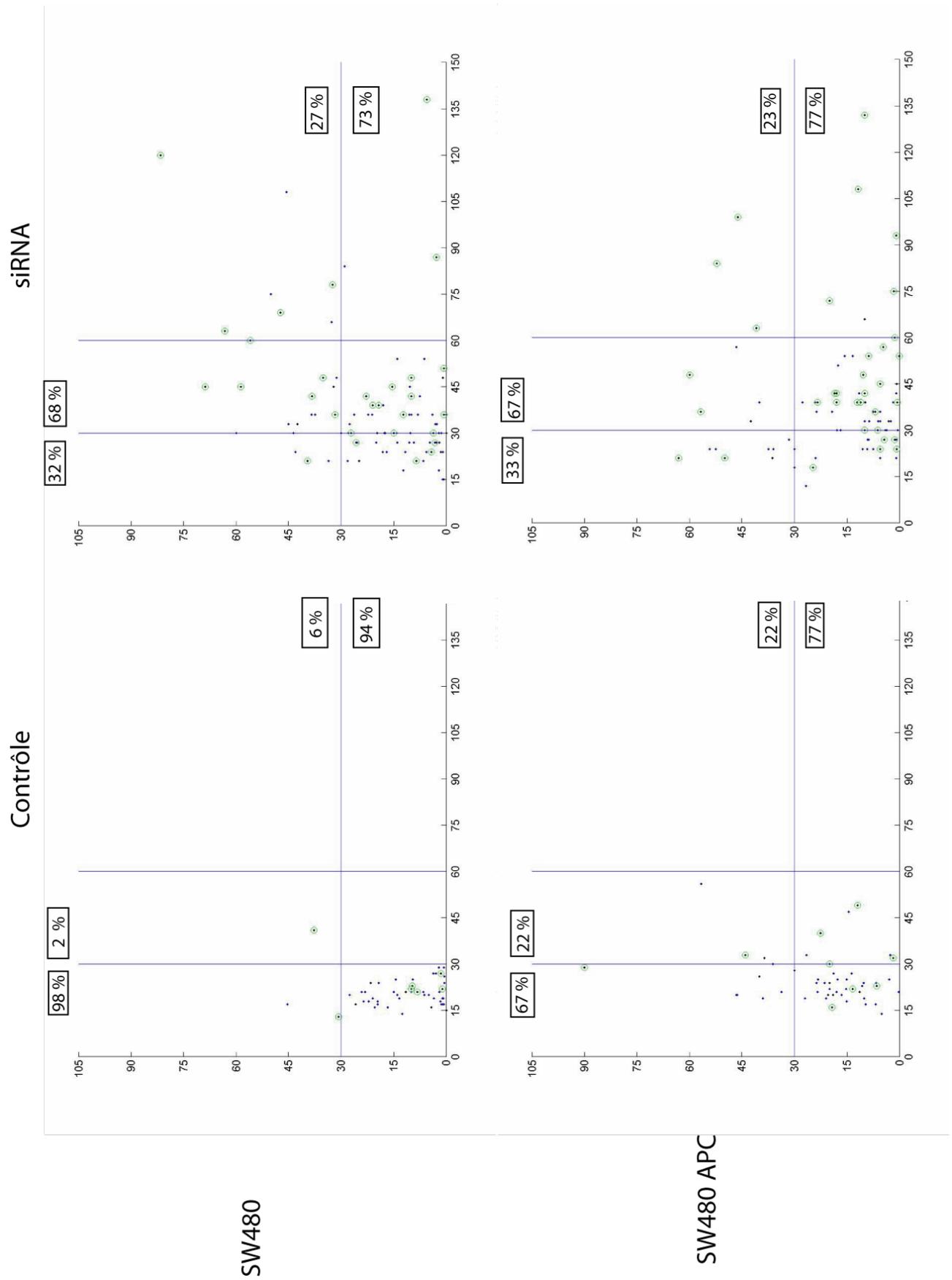


FIGURE 3.4 – Résumé des phénotypes pour les mitoses analysées

Dans chaque graphe les mitoses sont représentées par un point où l'abscisse représente la durée de la mitose en min et l'ordonnée l'angle formé par la plaque métaphasique avec l'axe en anaphase. Les points bleus représentent les mitoses ne subissant pas de phénomènes de bascule de la plaque métaphasique, les points avec les ronds verts, les mitoses subissant ce phénomène et les points noirs les mitoses où il n'est pas possible de déterminer le type de mouvement. En haut des graphes se trouve des cadres avec une valeur en noir. La valeur dans le cadre à gauche de la ligne de 30 min correspond au pourcentage de cellule ayant une durée de mitose inférieure à 30 min, de même que la valeur dans le cadre à droite représente le pourcentage de cellule ayant une durée de mitose supérieure à 30 min. A droite de chaque graphe se trouve également 2 cadres avec une valeur en noir. La valeur en noir du cadre en dessous de la ligne 30° représente le pourcentage de cellules ayant un angle entre plaque métaphasique et anaphase inférieure à 30°, la valeur dans le cadre au dessus représente le pourcentage de cellules ayant un angle supérieur à 30°, on parle alors de réorientation. On observe qu'il semble y avoir un lien entre durée de la mitose et bascule, car plus la cellule reste longtemps en mitose et plus elle a de chance de subir un phénomène de bascule. A l'inverse la relation entre réorientation et bascule est moins claire, par exemple dans l'expérience d'ARN interférent sur la lignée SW480-APC on n'observe pas de différence marquée pour la bascule entre les cellules avec ou sans réorientation (37 % et 41 % respectivement).

Dans des expériences d'ARN interférent ciblant CLIP-170 effectuées sur des cellules humaines et d'insectes, les cellules forment un fuseau correctement, et des microtubules astériens sont présents (Dzhindzhev *et al.*, 2005; Tanenbaum *et al.*, 2006; Watson & Stephens, 2006). Ces travaux ont montré un rôle important de CLIP-170 dans l'attachement stable des kinétochores aux microtubules du fuseau. Par ailleurs, en utilisant des analyses statistiques sur cellules immunomarquées, deux travaux publiés n'ont pas décelé de problème de positionnement du fuseau (Green *et al.*, 2005; Draviam *et al.*, 2006). Il est vrai que CLIP-170 était utilisé comme une sorte de contrôle par rapport à d'autres +TIPs, les protéines EB1 et APC, et qu'aucun effort n'a été entrepris pour déceler des effets plus subtils. C'est la raison pour laquelle le choix d'essayer de tester des fonctions proches de la Dynéine en inactivant CLIP-170 nous a paru raisonnable car cela devrait permettre le ciblage de fonctions proches de la Dynéine sans affecter le fuseau.

**Validations des effets obtenus en ciblant CLIP-170** Nos résultats montrent que nous avons obtenu une diminution effective de CLIP-170 avec les deux séquences. La technique d'ARN interférent présente un problème de toxicité lié à la transfection, et un problème potentiel d'effet "off-target", qui peut affecter le taux d'autres protéines, souvent de façon imprédictible (Jackson *et al.*, 2006). Nous ne sommes pas en mesure d'exclure de tels effets, mais dans les études publiées, les auteurs n'avaient pas observé, avec les séquences siRNA que nous avons choisies, un changement du taux des protéines EB1, APC, LIS1 et Dyneine (Tanenbaum *et al.*, 2006; Green *et al.*, 2005; Draviam *et al.*, 2006). En observant nos préparations immunomarquées, nous n'avons pas non plus observé des effets négatifs dans nos contrôles de transfection seule, de traitement ARNi sans transfection, et de transfection avec la séquence Scramble. Les effets qui sortent de notre analyse détaillée de séquences vidéo, nous confortent dans l'idée que nous avons bien reproduit les effets déjà connus, à savoir un effet sur l'efficacité de la migration des chromosomes vers l'équateur du fuseau, et une augmentation de la durée de la mitose allant jusqu'à  $> 150$  minutes. Nous considérons toutefois qu'il est nécessaire de compléter ce travail par une analyse plus approfondie de ces contrôles. D'une part, nous disposons de préparations marquées, qu'il conviendra d'analyser en comptant l'indice mitotique et le nombre de figures mitotiques mal positionnées et anormales. D'autre part, nous devons effectuer des acquisitions vidéo sur des cellules traitées par la séquence Scramble. Nos résultats sont donc encore préliminaires.

**Est-ce que CLIP-170 est impliquée dans le processus de l'orientation du fuseau ?** Comme attendu nous observons sur nos deux clones de SW480 un effet de prolongation de la durée de la mitose. Cette prolongation doit sans doute être classée parmi les effets "indésirables", car elle est probablement due à un effet sur la dynamique des microtubules. Il est connu que la durée de la mitose est très sensible à des doses très basses de nocodazole (20 nM), qui n'ont qu'un effet marginal sur la dynamique des mi-

crotubules. Nous avons réalisé des immunomarquages de la tubuline qui permettront de savoir si leur nombres, distribution et contacts avec le cortex sont affectés. Nous avons constaté que la diminution relative de CLIP-170 bloque l'apparition de la Dynactine pas au cortex. Ceci est en accord avec des observations non publiées de l'équipe de J. De Mey qui a montré la nécessité d'avoir des microtubules pour adresser la D/D au cortex latéral. En interphase, CLIP-170 est responsable du recrutement de la Dynactine sur les extrémités  $\oplus$  de microtubules en phase de polymérisation. Il est donc possible que la Dynactine soit transportée par les microtubules au cortex et qu'elle y soit déposée, peut être à des endroits où la Dynéine est déjà présente avec d'autre protéines telles  $G_{\alpha i}$  et NuMA. Il est également possible que CLIP-170 emmène une autre protéine qui active un récepteur pour le recrutement de la Dynactine au cortex. Le fait de ne plus disposer de la Dynactine au cortex est susceptible d'interférer avec la Dynéine. Il est donc concevable qu'au moins une partie des effets observés soient dus à une inactivation de la D/D.

En effet nous observons deux effets sur l'orientation du fuseau suite à la diminution de CLIP-170. Le premier est une augmentation du nombre de cellules SW480 effectuant une réorientation de plus de  $30^\circ$ . Mais aucun changement n'est observé dans les cellules SW480-APC. Ceci laisse penser que cette réorientation n'est peut-être pas dépendante de la Dynéine, et que l'effet dans les SW480-Vector est peut-être une conséquence d'un effet sur la dynamique des microtubules, mais il est trop tôt pour trancher. L'autre effet est une augmentation du nombre de cellules qui effectuent des mouvements de pendule de leur plaque métaphasique, et donc de leur fuseau. Deux observations nous paraissent intéressantes. Le phénomène existe dans environ 15 à 20% des cellules non traitées, avec dans les APC, une augmentation du nombre de cellules corrélées avec la durée de la mitose. Dans les cellules traitées, le nombre de cellules augmente sensiblement, mais on observe le processus dans de nombreuses cellules, dans lesquelles la durée de mitose n'est pas augmentée de beaucoup ( $< 50$  min), et l'effet est comparable pour les deux lignées. Ceci indique que le phénomène de mouvements de pendule est très sensible à une inactivation de CLIP-170 et de la Dynéine/Dynactine. L'effet 'pendule' est intéressant, car son équivalent dans des préparations marquées, une augmentation du nombre de fuseaux métaphasiques inclinés, est observé en inhibant la polymérisation de l'actine (Busson *et al.*, 1998), à priori sans effet sur les microtubules, et en sur-exprimant LIS1 (Faulkner *et al.*, 2000). Il est également intéressant de noter que l'effet a lieu sans d'autres effets profonds, dans des cellules qui prennent juste un peu plus de temps pour effectuer leur mitose. Comment alors expliquer cet effet ? Il est probable que la Dynéine/Dynactine soit localisée au cortex basal de la cellule, comme dans les fibroblastes. Les travaux de Schultz (Schultz & Onfelt, 2001) et O'Connell (O'Connell & Wang, 2000) ont montré un rapport entre cette localisation basale et certains mouvements du fuseau, ainsi que l'alignement planaire du fuseau. Nous avons observé des concentrations de Dynactine sur la membrane basale dans les cellules SW480-APC, et ce point sera vérifié pour les SW480.

En conclusion, en dépit de la nature préliminaire de nos résultats, nous pouvons conclure provisoirement que la diminution de CLIP-170 permettra de mieux comprendre le rôle de cette protéine et du moteur Dynéine/Dynactine dans l'orientation du fuseau. Comme attendu, il y a sans doute une combinaison de phénotypes qui compliquera l'interprétation que l'on pourra donner aux résultats. Nous avons pu montrer un rôle de CLIP-170 dans l'adressage de la Dynactine au cortex, et pu mettre au point et tester un protocole qui permettra à l'équipe d'effectuer des analyses phénotypiques approfondies.

## Analyse des divisions dans la niche par segmentation sur des acquisitions à haute résolution

L'architecture de la niche dans la crypte ne permet pas une analyse de l'orientation des divisions par rapport à l'axe long de la crypte à cause de la configuration qui ne comporte pas d'axe. Nous avons souhaité approcher la question de la division des cellules souches par une étude cytologique tri-dimensionnelle à haute résolution. En effet rien n'est connu sur la nature de l'asymétrie de la division des cellules souches. Le mécanisme le plus probable est une division asymétrique, c'est à dire conduisant à la ségrégation asymétrique de déterminants cellulaires. Une autre hypothèse peut être formulée, qui repose sur un mécanisme de division asymétrique par la ségrégation asymétrique du pôle apical et/ou basal (Wodarz & Huttner, 2003). En effet dans certains systèmes l'héritage ou non du pied basal va jouer un rôle dans le devenir des deux cellules filles. Nous avons donc développé une approche d'analyse morphométrique des cellules de la niche en division pour décrire la situation en anaphase/ télophase précoce. Pour cela des acquisitions à haute résolution ont été réalisées sur des cryptes immunomarquées pour l'actine et IQGAP1, ces deux signaux étant complémentaires pour la délimitation de la forme cellulaire. Les acquisitions ont été réalisées en 512 x 512, avec un zoom produisant un pixel X,Y de 100 nm, et un pas Z de 150 nm. Une acquisition sur une niche entière peut comporter jusqu'à 300 plans. Ces plans ont ensuite été déconvolués. L'acquisition déconvoluée est traitée sous Amira, plan par plan à l'aide d'un outil de segmentation semi-automatique permettant de délimiter le contour de la cellule en mitose, le contour de la crypte, et l'intérieur de la niche par la délimitation des pôles apicaux des cellules. La délimitation du contour de la cellule permet une reconstruction en trois dimension de chaque cellule, et d'analyser la situation pour le pôle apical et basal. En particulier il est possible d'évaluer si le sillon de clivage va transecter ou non le pôle apical, et si la partie basale de la cellule est répartie équitablement entre les deux cellules filles. Cette approche permet une étude très précise de la situation au pôle apical et basal. Sa mise en place est cependant difficile et délicate. Le point limitant dans cette approche réside dans la difficulté de trouver des cellules à analyser. Les divisions dans la niche sont rares, il est donc difficile de trouver des mitoses dans la niche. De plus le stade de la mitose est important, puisque l'analyse ne peut être réalisée que sur des cellules en anaphase/telophase. Enfin la crypte observée doit répondre à des critères de qualité nécessaires pour une acquisition correcte, à savoir la crypte doit être orientée avec son axe long aligné sur la lame. L'ensemble de ces critères rend la tâche difficile, si bien que nous n'avons pu observer que quatre cellules jusqu'à présent. Deux exemples de cellules analysées sont représentés dans les figures 3.5 et 3.6 page suivante.

Cette étude bien que très préliminaire a montré plusieurs points. Tout d'abord l'étude des quatre cellules en division montre que dans la niche également le fuseau peut s'aligner planairement avec le pôle apical. D'autre part l'observation de la taille présumé des cellules

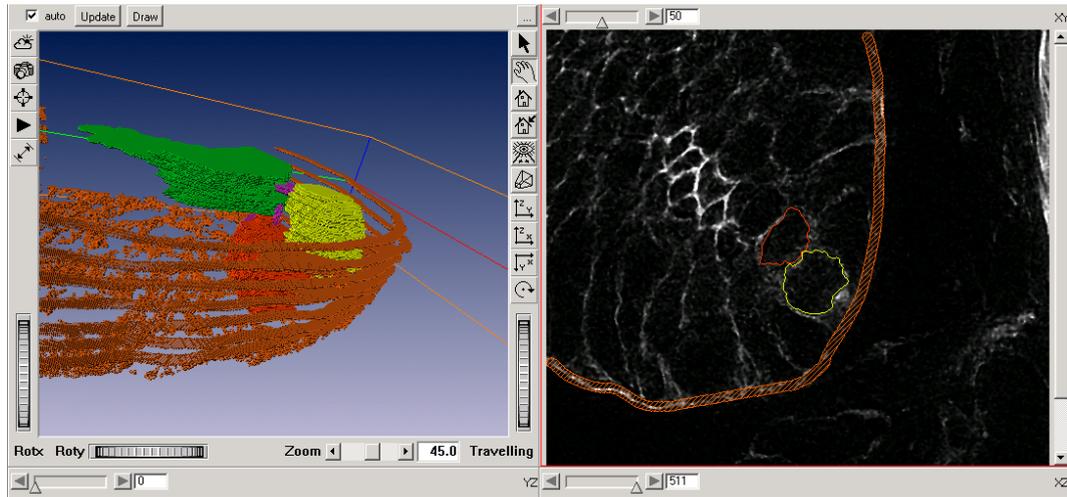


FIGURE 3.5 – Analyse morphométrique sous Amira

La figure de gauche montre la reconstitution 3D de la cellule en fin de telophase (cellule en rouge et jaune). Le pôle apical de cette cellule et des cellules environnantes est représenté en vert, et l'extérieur de la niche est montré par les lignes en orange. L'image de droite montre un plan avec la segmentation réalisée sur les deux cellules filles et l'extérieur de la niche.

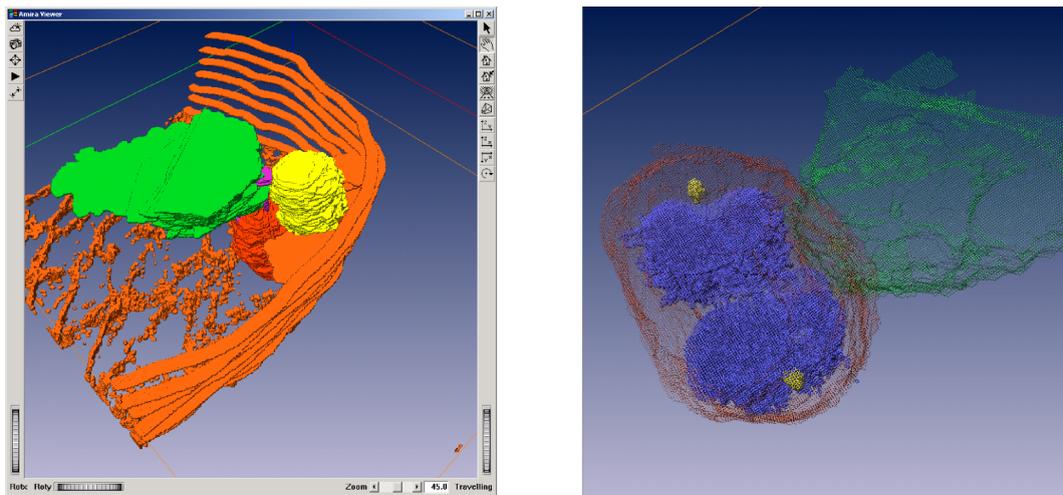


FIGURE 3.6 – Représentation 3D sous Amira

Représentation de la même cellule que précédemment, sous un autre angle. On peut apercevoir le pôle apical de la cellule en violet, utilisé pour déterminer si le sillon transecte équitablement le pôle apical (image de gauche). L'image de droite montre une autre cellule en 3D, avec les masses chromosomiques en bleu, les pôles du fuseau en jaune, le contour de la cellule en rouge et l'intérieur de la crypte en vert. En réglant la transparence on peut apercevoir les masses chromosomiques à travers la cellule, et également évaluer la situation au pôle apical.

filles dans le cas de télophase ne montre pas de différence majeure en terme de volume, ce qui suggère une division équitable en terme de taille des cellules filles. Il est évident que malgré nos efforts de sélection nous n'avons aucun argument valable pour affirmer que nous observons effectivement les cellules souches. Il faudrait pour cela disposer d'un

anticorps anti-Lgr5 ou de cryptes isolées de souris knock-in pour Lgr5 (Barker *et al.*, 2007). Il est cependant très probable que nous ayons observé des divisions des premières cellules issues de division de cellule souche. L'observation du pôle apical montre qu'a priori celui-ci sera équitablement réparti dans les deux cellules filles. La position du fuseau par rapport au pôle apical, et son orientation ne laisse pas supposer l'existence d'un mécanisme de ségrégation asymétrique du pôle apical. Néanmoins il est possible qu'un léger angle débouche sur une ségrégation asymétrique du pôle apical, dont la taille est très restreinte par la courbure de l'épithélium dans la niche. Autrement dit pour une confirmation totale ce point devra être analysé sur du tissu vivant à l'aide d'un marqueur du pôle apical. La situation au pôle basal est plus complexe. En effet la forme de la cellule, arrondie en mitose, est difficile à évaluer au pôle basal. En particulier le lien précis qu'entretient la partie basale de la cellule avec la lamina basale et les cellules environnantes est complexe. Malgré la qualité de nos acquisitions nous n'avons pu nous prononcer sur ce point. Il faudra songer à utiliser un autre marqueur. Là encore le marqueur Lgr5 pourrait s'avérer très intéressant car celui-ci remplit le cytoplasme de la cellule souche, ce qui rend plus aisé la délimitation de sa forme au niveau basal. Enfin cette approche a confirmé nos capacités d'analyse de situation architecturale complexe, et ouvre des perspectives intéressantes dans l'étude de la nature des divisions asymétriques des cellules souches.

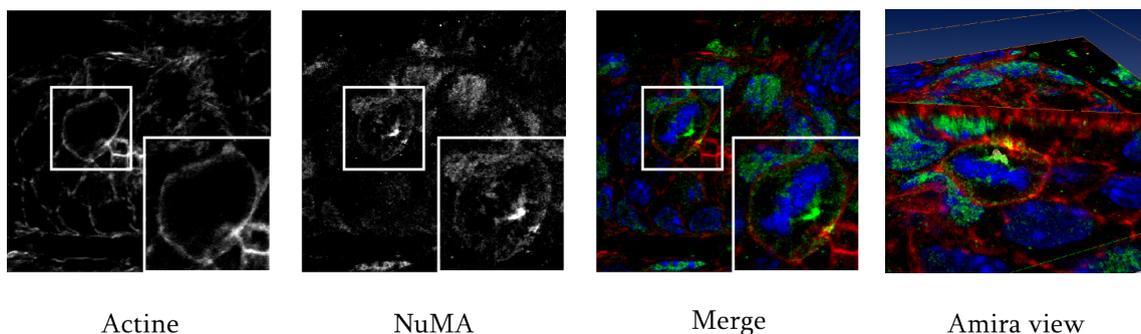


FIGURE 3.7 – Acquisition sur NuMA et représentation sous Amira avec une vue orthogonale

Exemple d'une acquisition sur une crypte immunomarkée pour NuMA. Dans la superposition l'actine est en rouge, NuMA en vert et le DAPI en bleu. On remarque en plus de la localisation aux pôles de NuMA un très léger marquage cortical de NuMA à proximité d'un pôle. Une vue orthogonale au plan montre l'accumulation corticale de NuMA (Amira view).

Plusieurs anticorps ont été testés sur les préparations de cryptes. Un nombre important d'anticorps ne fonctionnent pas dans les conditions utilisées, probablement à cause de la fixation utilisée. Nous avons utilisés des anticorps dirigés contre Scribble et IQGAP1, qui donnent tous les deux un beau marquage cortical, mais uniforme, donc *a priori* peu intéressant dans le but de révéler l'asymétrie des divisions des cellules souches. Il faut noter que dans une première approche nous nous sommes concentrés sur les cellules prolifératives, il faudrait confirmer par l'étude de cellules en division dans la niche, observations

plus difficile à réaliser. Une protéine a donné un marquage intéressant dans la crypte, NuMA. Nous avons en effet pu observer une localisation corticale très fine en "patch" de NuMA dans des cellules mitotiques (cf figure 3.7 page précédente). Cette localisation est non homogène, et correspond à la position d'un centrosome. Il sera très intéressant d'observer ce marquage dans des cellules en division de la niche, la localisation de NuMA pouvant potentiellement refléter un enrichissement d'autres protéines et ainsi révéler une asymétrie impliquée dans la division de la cellule souche.

## Discussion et Perspectives

### APC et la polarité apico-basale : rôle direct ou implication dans un complexe moléculaire ?

Une des conséquences de la ré-expression d'une protéine APC entière dans la lignée SW480 est un renforcement de la polarité apico-basale. Pour autant aucun rôle direct de la protéine APC dans l'établissement de la polarité apico-basale n'a été décrit jusqu'à présent bien qu'il existe des protéines pouvant faire le lien entre les complexes impliqués dans la polarité apico-basale et la protéine APC.

Parmi elles, la protéine Scribble est particulièrement intéressante car elle joue un rôle capital dans l'établissement de la polarité apico-basale. Or il a été montré d'une part qu'APC est nécessaire dans l'adressage de Scribble à la membrane latérale et que d'autre part la perturbation de l'interaction entre ces deux protéines entraîne une perte des jonctions adhérentes (Takizawa *et al.*, 2006). Ces données établissent indirectement un rôle pour la protéine APC dans l'intégrité des jonctions adhérentes, ce qui corrobore parfaitement nos données sur les cellules SW480. En effet dans les cellules SW480, où la protéine APC exprimée ne possède pas les domaines de liaison à Scribble, celle-ci n'est pas adressée à la membrane et ne peut participer à l'établissement des jonctions adhérentes. L'expression d'une protéine APC entière dans les SW480-APC permet d'adresser Scribble à la membrane, et ainsi d'assembler les complexes jonctionnels. Il sera donc intéressant de tester la colocalisation de Scribble et d'APC dans les lignées utilisées, à la condition de disposer d'un anticorps anti-APC spécifique.

La protéine Dlg est tout autant intéressante du fait de son importance durant la migration et de sa collaboration avec APC (cf partie "APC et la polarité" page 49) nécessaire à la formation d'un complexe impliqué dans la stabilisation des microtubules. Mais Dlg joue aussi un rôle dans la polarité apico-basale. Dlg est en effet localisée à la membrane latérale et impliquée dans le recrutement de PI3K (phosphoinositide 3-kinase) (Laprise *et al.*, 2004), une kinase activée par la E-cadhérine qui participe à l'intégrité des jonctions (Laprise *et al.*, 2002). De plus la diminution du taux endogène de Dlg altère l'intégrité des jonctions adhérentes (Laprise *et al.*, 2004). Il est intéressant de considérer ces éléments connaissant la localisation corticale d'APC en interphase d'une part, et l'interaction entre APC et Dlg dans certaines situations. En effet dans une cellule en migration le complexe contenant Par-6 et PKC $\zeta$  va phosphoryler GSK3 $\beta$  ce qui empêche la phosphorylation d'APC et permet son interaction avec Dlg. Cette interaction est capitale pour la réorientation du MTOC, car l'expression dans des astrocytes en migration d'un fragment Nter d'APC tronqué pour les domaines de liaison aux microtubules et à EB1 et du domaine PDZ de liaison à Dlg bloque la réorientation du MTOC. Pour autant qu'une interaction entre ces deux protéines est nécessaire, les travaux de S. Etienne-Manneville et A. Hall ont montré que cette interaction ne conditionne par leur localisation (Etienne-Manneville

*et al.*, 2005). En effet l'inhibition de l'interaction entre APC et Dlg n'a pas de conséquence sur leur localisation aux bouts  $\oplus$ Microtubule!bout  $\oplus$  des microtubules, ce qui signifie que la situation dans les SW480 n'a *a priori* pas d'influence sur la localisation correcte de Dlg. Mais il s'agit ici de la polarité apico-basale et d'un autre rôle de Dlg, ce qui permet de supposer que les modalités d'interaction entre les deux protéines sont peut être différentes. Il est en effet possible d'envisager une nécessité d'interaction entre APC et Dlg pour la localisation correcte de Dlg à la membrane, de même que pour son fonctionnement dans la polarité apico-basale. L'interaction entre ces deux protéines est nécessaire à la réorientation du centrosome, l'association des microtubules avec la membrane plasmique et la migration ce qui signifie que le domaine de liaison à Dlg d'APC joue un rôle dans la fonction de Dlg. On peut raisonnablement imaginer que cette interaction joue également un rôle dans les cellules SW480-APC, exprimant la protéine APC entière. Il est possible de tester le rôle de cette interaction par l'expression du domaine de liaison d'APC à Dlg qui perturbe l'association de la protéine entière ou l'utilisation de mutant Dlg ne pouvant lier APC. Ceci permettrait de savoir si APC agit sur la polarité par l'intermédiaire de Dlg et d'en savoir un peu plus sur le rôle d'APC dans la polarité.

Enfin APC pourrait jouer un rôle dans la polarité apico-basale via sa liaison à la  $\beta$ -caténine. Comment expliquer la relocalisation corticale de la  $\beta$ -caténine suite à l'expression d'APC ? Il a été montré dans les cellules SW480-APC une diminution de la voie Wnt, indiquant qu'APC est de nouveau fonctionnelle au sein du complexe Axine/GSK3 $\beta$  (Faux *et al.*, 2004). Le fait que la  $\beta$ -caténine soit redirigée vers la membrane suggère une modification des propriétés des jonctions adhérentes, et il a été montré en outre une augmentation de la quantité intracellulaire ainsi qu'une modification post-traductionnelle de la E-cadhérine (Faux *et al.*, 2004). D'autre part la  $\beta$ -caténine est nécessaire dans l'adressage à la membrane d'APC (Sharma *et al.*, 2006). On peut émettre l'hypothèse que l'expression d'APC entière va permettre l'adressage d'APC à la membrane, où elle joue un rôle dans l'adhésion inter-cellulaire, via ses interactions avec Scribble et Dlg. Ceci va assurer l'intégrité des jonctions adhérentes et permettre la relocalisation de la  $\beta$ -caténine à la membrane. Nous avons essayé de localiser APC dans les deux lignées avec des anticorps fournis par E. Morrison. En particulier nous avons souhaité montrer la localisation d'APC entière par l'utilisation d'anticorps dirigés contre l'extrémité C<sub>ter</sub> d'APC. Malheureusement ces anticorps reconnaissent des structures dans notre contrôle négatif, la lignée SW480 qui exprime une protéine APC dépourvue des domaines normalement reconnus par les anticorps utilisés. Nous ne sommes donc pas en mesure de documenter la localisation intracellulaire de l'APC exogène.

## APC dans la régulation des générateurs de force

Notre étude sur le comportement du fuseau a montré des différences importantes suite à la re-expression d'APC. D'une part les paires de kinétochores sont mieux orientées avec

l'axe du fuseau, sans que la distance inter-kinétochores ne soit profondément modifiée. Il faut souligner que ces observations ne sont pas irréfutables du fait de la difficulté à déterminer précisément la position du kinétochore. Notons cependant que l'erreur de mesure est certainement moindre pour l'angle que pour la distance. La correction de l'orientation des paires de kinétochores sans augmentation de tension est difficile à réconcilier avec le modèle couramment admis qui stipule que les paires de kinétochore sous tension sont orientées. Il est possible que la quantité d'APC exprimée soit trop faible pour avoir un effet significatif sur la tension mais suffisant pour modifier l'orientation des paires de kinétochores. Il est connu que les cellules SW480 sont CIN+ (Lengauer *et al.*, 1997; Tsuchimi *et al.*, 2001), ce qui explique le fait que les kinétochores soient moins bien attachés comparativement à des cellules CIN-. Parallèlement nous avons constaté une augmentation significative de la durée de la métaphase. Cette augmentation ainsi qu'une meilleure orientation des paires de kinétochores suggèrent que la connexion des microtubules aux kinétochores est améliorée, ou que la cellule est capable de détecter des problèmes d'alignement de chromosome à la plaque métaphasique et de retarder l'entrée en anaphase. Il conviendra d'étudier le caractère CIN- ou CIN+ des cellules exprimant APC.

L'analyse du comportement du fuseau dans les lignées SW480 a montré que l'expression d'APC a des conséquences sur plusieurs paramètres :

- le fuseau est plus dynamique
- le fuseau est plus souvent excentré
- il y a plus de réorientations

Ces données suggèrent que les forces exercées sur le fuseau sont plus importantes. Comment expliquer cette différence de forces ? Deux hypothèses sont à considérer : les générateurs de force sont plus sollicités, et/ou la dynamique des microtubules est différente. Concernant la dynamique des microtubules il a été montré que l'expression d'une forme tronquée devrait agir comme dominant négatif (Green *et al.*, 2005). Dans le modèle étudié on peut s'interroger sur la capacité de la protéine APC exprimée à agir comme dominant négatif au vu de la quantité exprimée. Il ne faut pourtant pas écarter cette hypothèse car une perturbation mineure de la dynamique des microtubules a des conséquences importantes sur le comportement du fuseau. En effet l'utilisation de doses nanomolaires, qui dépolymérisent uniquement les microtubules astériens, peut entraîner une perturbation de l'orientation du fuseau sans perturber l'alignement (Thery *et al.*, 2005). Il est donc possible d'envisager que la faible quantité d'APC entière exprimée soit suffisante pour perturber la dynamique des microtubules et ainsi l'orientation du fuseau, sans pour autant influencer l'alignement planaire. Une observation annexe suggère une autre hypothèse. L'observation des localisations corticales de CLIP et NuMA et la quantification de leur co-organisation montrent que ces deux protéines sont plus co-organisées dans les cellules exprimant APC. Cette augmentation de l'organisation, qui n'est pas pour autant une mesure de l'interaction entre ces deux protéines, peut être une conséquence de la po-

larité apico-basale plus prononcée, ou une conséquence de l'expression d'APC elle-même dans l'adressage ou l'assemblage corticaux de ces complexes. Les liens entre NuMA et APC ne sont pas connus et aucune interaction directe entre CLIP-170 et d'APC n'a été reportée. Cependant CLIP-170 interagit avec IQGAP1, qui peut également lier APC. De même que CLIP-170 interagit avec EB1, un partenaire d'APC. Dans les deux cas, un complexe de trois protéines pourrait donc se former *in vivo*. L'augmentation de la co-organisation entre CLIP-170 et NuMA suggère une augmentation de l'activation des générateurs de force. La présence de CLIP au cortex est une indication indirecte de la présence de la Dynéine avec laquelle NuMA peut interagir. Dans l'hypothèse d'un rôle de la Dynéine comme générateur de force, une augmentation de la co-organisation entre CLIP et NuMA pourrait donc se traduire par une augmentation de l'activation de la Dynéine, et d'une augmentation des forces exercées. Parallèlement on peut imaginer que la Dynéine apporte des protéines au cortex, et que l'augmentation de la colocalisation de NuMA avec CLIP permettrait une plus grande activation des complexes apportés par la Dynéine. L'expression d'APC, par son effet sur la polarité, ou sa liaison à IQGAP1 et EB1, joue probablement un rôle dans cette augmentation de la co-organisation de CLIP et NuMA<sup>2</sup>.

Très récemment une interaction directe entre APC et Lis1 ainsi qu'entre APC la Dynéine a été reportée (Hebbar *et al.*, 2008). Cette observation suggère évidemment que l'interaction de ces protéines se produit au cortex et qu'une collaboration entre ces protéines intervient dans la régulation des générateurs de force. Le rôle précis de la Dynéine dans la génération de forces dans les cellules de mammifères reste une question débattue. En effet, sur la base des observations réalisées dans la levure montrant un rôle direct de la Dynéine dans la génération de forces, des observations réalisées dans les cellules MDCK montrant une accumulation de la Dynéine/Dynactine au cortex, et plus récemment des observations indiquant un rôle de la Dynéine dans la génération de forces chez *C. elegans*, il est raisonnable de penser que la Dynéine est responsable de la génération de forces. Pour assoir définitivement cette hypothèse il manque cependant l'observation cruciale d'une corrélation entre un enrichissement en Dynéine/Dynactine au cortex et le contact d'un microtubule astérien suivi d'un mouvement du fuseau.

Selon une autre hypothèse, la Dynéine jouerait un rôle dans l'apport au cortex, soit de générateurs de forces, soit d'éléments régulateurs de ces générateurs de forces. Quels pourraient être ces générateurs ? De multiples indices suggèrent que les protéines G pourraient intervenir dans la régulation de la dynamique des microtubules. D'une part les protéines G ont la capacité de s'associer aux microtubules. Cette association augmente l'activité

---

2. La méthode employée en premier lieu pour la quantification de cette co-organisation introduisait un biais très important sur la sélection des clusters utilisés pour calculer la co-localisation. Une deuxième analyse ainsi qu'une deuxième étude sur une nouvelle série de cellules immunomarquées ne semblent pas révéler de différences fondamentales entre les deux lignées. Il convient donc de ne pas tenir compte de ces conclusions, le seul résultat fiable des ces mesures étant que dans les deux cellules les complexes CLIP et NuMA sont co-localisés au cortex

GTPasique des microtubules, ce qui se traduit par une augmentation de la dynamique liée à une augmentation des évènements de catastrophe (Roychowdhury *et al.*, 1999). D'autre part la mesure par Labbé et coll. de la durée de résidence des microtubules au cortex d'embryons de *C. elegans* a révélé des différences entre le cortex antérieur et le cortex postérieur (Labbé *et al.*, 2003). Il faut noter que la durée de résidence des microtubules au cortex a été revue nettement à la baisse par l'équipe de F. Nedelec (1 à 2 sec contre une quinzaine pour Labbe) (Kozlowski *et al.*, 2007). Néanmoins l'ensemble des observations ayant été réalisées dans les mêmes conditions nous pouvons raisonnablement penser qu'il existe effectivement une différence entre le cortex antérieur et le cortex postérieur. Cette différence est abolie dans les mutants *par2*, *par3* et les doubles mutants *par2/par3*, ainsi que dans les doubles mutants *goa-1/gpa16*. Ceci suggère un rôle des protéines PAR dans le contrôle de la dynamique des microtubules, vraisemblablement via des intérateurs situés en aval des protéines PAR. L'observation d'une durée de résidence sensiblement comparable dans les embryons sauvages et mutants *goa-1/gpa16* (Labbé *et al.*, 2003) va à l'encontre d'un rôle direct des protéines G dans la dynamique des microtubules. En effet si celles-ci étaient directement impliquées, la dynamique des microtubules devraie être diminuée, avec une durée de résidence plus longue. Pour autant les protéines G jouent clairement un rôle central dans la régulation des forces exercées.

Une autre hypothèse intéressante quand au rôle d'APC dans la régulation des générateurs de force concerne son interaction avec IQGAP1. IQGAP1 est une protéine clé dans la connexion des cytosquelette de microtubules et d'actine. En effet IQGAP1 est capable de se lier à CLIP170 et donc aux microtubules, mais IQGAP1 est également un effecteur de Cdc42 et Rac, et sa liaison à CLIP-170 crée ainsi un lien entre le cytosquelette d'actine et celui des microtubules (Fukata *et al.*, 2002). Il existe de plus une interaction directe de IQGAP1 à APC (Watanabe *et al.*, 2004). Il est donc possible d'imaginer un mécanisme de polarisation du cortex par l'action combinée d'APC et IQGAP1 activée par Cdc42 et/ou Rac, qui ne serait fonctionnel qu'en présence d'une protéine APC entière. Ce mécanisme reste hypothétique compte tenu que ces interactions n'ont pas été observées en mitose. Il serait intéressant dans un premier temps d'observer s'il existe une colocalisation entre APC et IQGAP1 dans des cellules mitotiques et ensuite de confirmer, par co-immunoprécipitation sur des cellules synchronisées, que l'interaction entre ces deux protéines est directe. Il serait également intéressant d'observer la dynamique d'APC en mitose et après traitement à l'ARN interférent contre IQGAP1 en utilisant une protéine APC couplée à la GFP.

## APC et PCP : quel lien ?

Les mesures d'orientation des fuseaux par rapport à l'axe long des cryptes ont abouti à plusieurs conclusions intéressantes. Tout d'abord il existe clairement une orientation préférentielle du fuseau avec l'axe long de la crypte car la proportion de fuseaux orientés

est bien supérieure à celle attendue dans le cas d'une orientation aléatoire. Il existe par conséquent un mécanisme qui contrôle l'orientation avec l'axe long. Au vu du contexte du tissu et de sa forme, le premier mécanisme qui vient à l'esprit est la division orientée sous contrôle de la polarité planaire bien qu'il existe actuellement peu d'exemples de divisions orientées sous contrôle de la PCP. Les exemples connus sont les divisions orientées dans le tube rénal (Saburi *et al.*, 2008), et dans le développement de la drosophile (Baena-López *et al.*, 2005) et du poisson zèbre (Danio rerio) (Gong *et al.*, 2004). Mais ces exemples sont difficilement transposables à la situation très particulière de la crypte. Non seulement ce tissu est en renouvellement permanent, à l'inverse des systèmes cités qui présentent une prolifération limitée dans le temps, et plus associée à une migration.

Nos résultats montrent qu'une mutation dans le gène *Apc* n'entraîne aucune perturbation de la division orientée. Seule la situation rencontrée en absence totale d'APC ou dans les ACF, provoquée vraisemblablement par une perte de l'allèle sauvage, provoque une perturbation de l'orientation préférentielle. Ceci suggère bien un rôle d'APC dans ce processus. Mais comment connecter APC et la PCP ? Récemment le groupe de A. Hall a montré une dépendance d'APC envers Dishevelled pour réorienter le centrosome pendant la migration. En effet Dishevelled et Wnt5a sont nécessaires pour la localisation correcte d'APC aux bouts  $\oplus$  Microtubule /  $\ominus$  des microtubules. Ceci établit donc un lien entre la voie Wnt non canonique et APC (Schlessinger *et al.*, 2007). Comment transposer ces données à la crypte ? Le mécanisme étudié ici est très différent de celui rencontré dans la crypte, où les cellules sont hautement polarisées, au moins suivant l'axe apico-basal, et certainement capable de répondre à une polarité planaire. Dans l'hypothèse où APC joue un rôle dans la régulation des générateurs de force et/ou de la polarité, il est licite de postuler que c'est un dialogue entre un mécanisme global d'établissement de la polarité, et un senseur intracellulaire qui va 'écouter' cette polarité, et permettre que l'orientation finale du fuseau soit bien dans l'axe de polarité. APC peut donc potentiellement être impliquée dans ces deux fonctions, par son rôle possible dans la régulation des générateurs de force ou des complexes impliqués dans leur régulation, ainsi que dans la polarité planaire par une participation à l'établissement de la polarité sous le contrôle de la voie Wnt/PCP.

Chez *D. melanogaster*, certaines protéines clés de la PCP font partie de la superfamille des cadhérines, telles Dachso, Flamingo ou Fat. On a vu l'importance de la protéine Dachso dans le mécanisme de PCP à travers l'exemple des divisions orientées dans l'aile de la drosophile (Baena-López *et al.*, 2005). La protéine Fat qui est un suppresseur de tumeur est intéressante à plus d'un titre. D'une part une des cadhérines de la famille Fat est fortement exprimée dans certains organes, en particulier dans la partie distale de l'intestin, où elle participe au développement et à l'acquisition d'une morphologie correcte ainsi que dans certains organes tubulaires (Castillejo-López *et al.*, 2004). La protéine Fat joue donc un rôle important dans la morphogénèse, par son action dans l'adhésion ou

dans la PCP. Comment distinguer entre ces deux voies ? Une étude portant sur le rôle des domaines de la protéine a montré (Matakatsu & Blair, 2006) que le domaine intracellulaire de Fat est suffisant pour assurer la PCP, alors que le domaine extracellulaire peut réguler négativement la prolifération des disques imaginaires. Ainsi les fonctions d'adhérence et autres de la Fat semblent être distinctes, avec une fonction de régulation de la prolifération par son domaine extracellulaire (Bennett & Harvey, 2006). Très récemment le rôle de Fat4 chez la souris a été étudié. Il avait été postulé que la perturbation de l'orientation des divisions dans le tube rénal était dû à un défaut de PCP (Fischer *et al.*, 2006). L'hypothèse vient d'être confirmée avec l'étude des souris *fat4*  $-/-$ , qui présentent des kystes rénaux. L'analyse des orientations a montré que les fuseaux ne sont plus correctement orientés selon l'axe du tube. De plus l'orientation des touffes ciliaires de la cochlée est perturbée. Il existe donc un défaut général de la PCP dans ces souris, qui conduit à la formation de kyste dans le rein (Saburi *et al.*, 2008). Fat4 interagit avec Vang2, un autre gène clé de la PCP de la cochlée (Montcouquiol *et al.*, 2003). Il existe en plus un lien entre les cadhérines et la voie Wnt classique, par l'intermédiaire de la régulation de la  $\beta$ -caténine. La cadhérine peut en effet moduler l'activité de la  $\beta$ -caténine et ainsi réguler la voie Wnt (Noles & Chenn, 2007). L'ensemble de ces données tend à concevoir un modèle de régulation des divisions orientées par des protéines clés de la voie Wnt/PCP, et au vu de la dépendance d'APC envers Dishevelled et Wnt5a pour sa localisation, il devient capital d'évaluer d'une part la polarité planaire présente dans la crypte, et d'autre part son lien avec APC.

Une question majeure demeure d'une part sur la nature de l'asymétrie de la division des cellules souches, et d'autre part sur le lien entre l'asymétrie et la voie Wnt. Plusieurs hypothèses sont envisageables, et la réponse viendra certainement d'une combinaison d'approches impliquant de la microscopie sur du tissu vivant. Au vu du rôle essentiel de la voie Wnt dans ce tissu, il est légitime d'envisager un rôle de cette voie dans le contrôle des divisions des cellules souches, via la voie Wnt/PCP. Une particularité de la conformation de la niche vient compliquer le schéma : en effet les cellules souches dans le côlon sont supposées résider au fond de la crypte. Or cette structure, une hémisphère, ne possède pas d'axe long préférentiel. Il est donc difficile d'appliquer à la niche les connaissances acquises sur des épithéliums plats. On peut par contre faire un parallèle avec les cellules souches germinales chez le mâle de la *Drosophile* (Yamashita *et al.*, 2007), ou même avec la situation du neuroblaste, où le contact avec l'épithélium induit une forme de polarité et le maintien d'un centrosome au contact de cette zone, qui dicte par la suite l'orientation du fuseau (Siegrist & Doe, 2006). L'augmentation du nombre de cellules souches potentielles chez les patients FAP suggère un rôle possible d'APC dans la régulation de la fréquence des divisions asymétriques. Etant donné l'implication possible d'APC dans l'orientation du fuseau, et sa connexion avec la voie Wnt/PCP, on peut imaginer que, dans le cas

de mutations APC, la cellule souche n'est plus en mesure d'orienter son fuseau avec la PCP, parce qu' APC n'est plus en mesure de réguler les générateurs de forces, ce qui provoque une dérégulation des cellules souches, pouvant conduire à une augmentation de leur nombre. L'utilisation du marqueur de cellules souches Lgr5 devrait permettre de mieux comprendre l'asymétrie des divisions dans un contexte sain. L'observation de ce marqueur dans un contexte muté pour Apc devrait en plus permettre de répondre à la question de l'implication potentielle d'APC dans la régulation des divisions des cellules souches.

## **Le cancer du côlon et l'instabilité chromosomique : rôle d'APC et/ou de la voie Wnt ?**

La localisation d'APC aux kinétochores et sa participation dans l'attachement des microtubules suggère que des mutations dans Apc pourraient interférer avec le mécanisme responsable de l'instabilité chromosomique (*Chromosome Instability*, CIN). Récemment des données expérimentales ont apporté des éléments nouveaux sur le rôle possible d'APC dans ce mécanisme, et sur la connexion entre APC et la voie Wnt. L'observation initiale d'APC aux kinétochores, ainsi qu'une augmentation des cellules tétraploïdes et des chromosomes retardataires dans des cellules portant des mutations pour Apc a suggéré un rôle d'APC dans la ségrégation des chromosomes (Fodde *et al.*, 2001; Kaplan *et al.*, 2001). L'équipe de P. Sorger a montré que la diminution d'APC par ARN interférent entraîne une perturbation de l'attachement des microtubules aux kinétochores ce qui perturbe l'orientation des paires de kinétochores (Draviam *et al.*, 2006). Curieusement ce défaut n'est pas détecté ou s'il l'est, cela n'entraîne pas l'arrêt de la cellule en mitose, qui progresse donc jusqu'à la cytokinèse indiquant qu'APC n'est *a priori* pas nécessaire au contrôle de l'assemblage du fuseau. Cependant APC interagit avec Bub1 et BubR1 aux kinétochores, deux protéines impliquées dans le contrôle de l'assemblage du fuseau. Après réduction d'APC ces deux protéines sont fortement diminuées aux kinétochores, ce qui suggère malgré tout un rôle d'APC dans le fonctionnement du contrôle de l'assemblage du fuseau (Dikovskaya *et al.*, 2007). Son absence pourrait alors permettre aux cellules présentant un problème d'alignement des chromosomes d'échapper au contrôle et ainsi de déboucher sur des phénomènes de CIN. Nos observations montrent que suite à l'expression d'APC entière dans un contexte APC tronquée, les paires de kinétochores sont mieux orientées avec l'axe du fuseau. Ces observations sont en quelque sorte contradictoires avec les observations dans les cellules de souris Min et 1638T (Fodde *et al.*, 2001; Kaplan *et al.*, 2001). Dans ces deux études les auteurs montrent une perturbation de la ségrégation des chromosomes dans des cellules mutées pour Apc, et concluent que la mutation entraîne via un rôle d'APC aux kinétochores un problème d'aneuploidie. Nos résultats montrent qu'au contraire en situation d'APC tronquée/APC entière l'attachement des microtubules aux kinétochores semble amélioré. Cependant la situation différente en terme de quantité

exprimée ne permet pas une comparaison directe de nos résultats à ceux précédemment établis. De plus l'observation de culture des cellules SW480-APC montrent la présence de cellules multinuclées, ou clairement tétraploïde voir plus. Pour autant nous n'avons observé aucun problème de cytotinèse, comme décrit par Kaplan (Caldwell *et al.*, 2007) et Nathke (Dikovskaya *et al.*, 2007). L'augmentation de la durée de métaphase pourrait suggérer que dans l'ensemble le fuseau attend que les chromosomes soient correctement alignés, mais que dans certains cas le contrôle est inefficace. Il sera important de comprendre comment ces cellules multinuclées apparaissent au cours de la culture.

Parallèlement au rôle possible d'APC dans le processus de CIN des études récentes suggèrent un rôle direct de la voie Wnt dans ce même processus. Le groupe de Aoki a confirmé que la suppression d'APC entraîne une élévation de CIN (mesuré par la présence de pont en anaphase entre les deux cellules) mais surtout, il a montré que l'expression d'une forme constitutivement active de la  $\beta$ -caténine a les mêmes effets (Aoki *et al.*, 2007). Le groupe de Behrens montre en plus une activation de l'expression de l'axine (conductine 2), gène cible de la voie Wnt, parallèlement à une élévation de CIN (Hadjihannas *et al.*, 2006). Autrement dit la présence de CIN dans les cellules dépletées pour APC qui était attribuée au rôle d'APC sur le cytosquelette, semble explicable par d'autres voies d'activation indépendentes.

## APC, les centrosomes et la polarité

Un ensemble d'observations ayant confirmé le rôle des centrosomes dans la polarité en général et dans les divisions asymétriques en particulier il est intéressant d'évaluer quel est le rôle d'APC dans ces structures. L'étude de la division chez la levure a montré que les deux Spindle Pole Body (SPB, l'équivalent du centrosome) ne sont pas égaux, le SPB le plus ancien étant toujours ségrégué dans la cellule fille (Pearson & Bloom, 2004). Cette notion a été étayée récemment par une série d'études dans le neuroblaste de drosophile et dans les cellules souches germinales du mâle chez la *Drosophile* qui présentent une asymétrie des centrosomes. Le centriole le plus ancien est en effet toujours conservé par la cellule souche (Yamashita *et al.*, 2007). Dans le même modèle, cette équipe avait déjà montré le rôle prépondérant d'APC dans la régulation de l'orientation des divisions. Les données de ce modèle sont néanmoins difficilement transposables à la crypte, notamment à cause de l'importance du pivot (ou nœud) au contact duquel se trouvent les cellules souches, structure très particulière et dont l'existence n'est pour l'instant pas décrite dans la crypte même si l'on parle de niche. Cette asymétrie des centrosomes a également été rapportée chez la drosophile. Le centriole père a une activité de nucléation des microtubules plus importante au début de la mitose que le centriole fils, et il est capable d'initier l'organisation des microtubules en un aster avant le centriole fils. Le centriole fils va se déplacer avant de commencer à pouvoir organiser un aster en promouvant la polymérisation des microtubules. La perturbation de cette asymétrie des centrosomes en-

traîne une perturbation de l'orientation correcte du fuseau (Rusan & Peifer, 2007). Dans ce mécanisme le centriole père reste toujours associé au pôle apical, et c'est le centriole fils qui va sonder la cellule avant d'assembler le fuseau, en collaboration avec le centriole père, une fois localisé à l'opposé de celui-ci (Rebollo *et al.*, 2007). Il est important de noter que l'interaction du neuroblaste avec l'épithélium situé au dessus est capitale dans la stabilisation du centrosome et des mécanismes subséquent (Siegrist & Doe, 2006). On voit donc ici la ressemblance avec le système des cellules souches germinales chez le mâle de la Drosophile, et d'autre part la difficulté à transposer ces données au système de la crypte, à moins d'envisager la niche comme un pivot. Ces mécanismes font écho à l'importance des microtubules émanant du centrosome et impliqués dans l'établissement de la polarité. On a vu ce mécanisme à l'œuvre dans le neuroblaste, grâce à l'action de Khc-73 et Dlg (Siegrist & Doe, 2005). Plus récemment un mécanisme similaire a été rapporté chez *C.elegans*. L'utilisation d'ARN interférent dirigé contre la tubuline montre qu'il y a un délai dans l'établissement de la polarité antéro-postérieure et les embryons présentant cette polarité n'ont pas une délétion totale de la tubuline mais au contraire contiennent un aster d'où émanent quelques microtubules (Tsai & Ahringer, 2007). Ceci indique une dépendance dans l'établissement de la polarité à l'égard d'un signal émanant du centrosome (pour une revue sur le sujet consulter (Siegrist & Doe, 2007)). APC pourrait jouer un rôle dans ce processus par au moins deux façons : d'une part par sa localisation aux centrosomes, d'autre part par un rôle au cortex et/ou bout  $\oplus$  Microtubule !bout  $\oplus$  des microtubules. Il a été observé dans des cellules de mammifères une localisation préférentielle d'APC aux centrioles pères (Louie *et al.*, 2004). Cette localisation est reportée dans plusieurs lignées (Langford *et al.*, 2006b), mais la localisation aux centrosomes en mitose n'a pas été étudiée. Si APC est effectivement un composant du centrosome il est probable que cette localisation soit conservée en mitose. On peut ainsi imaginer qu'APC via son rôle au centrosome et éventuellement dans la dynamique des microtubules est importante en mitose dans la lecture correcte de la polarité et dans le maintien de cette polarité par des processus dépendant d'un signal émanant du centrosome et transporté par les microtubules. La aussi l'étude de la dynamique d'APC en mitose se révélera capitale pour une meilleure compréhension de son implication dans les mécanismes d'orientation du fuseau.

Un ensemble de données soulignent le rôle possible d'APC dans le contrôle de l'orientation. APC pourrait être impliqué via une localisation corticale et la participation à l'assemblage de complexes impliqués dans la régulation des générateurs de forces. APC pourrait également jouer un rôle via une fonction dans la transmission de la voie Wnt/PCP. Nos résultats montrent à ce titre une implication d'APC dans la division orientée. Pour autant nous n'avons pas d'éléments indiquant quelle est la fonction d'APC impliquée dans ce processus. Ce travail pourrait donc se poursuivre logiquement par la mise en évidence d'une polarité planaire dans la crypte, par l'étude de la fonction de cette PCP dans la

régulation des divisions asymétriques des cellules souches, et par l'observation des effets de mutations dans le gène *Apc* sur cette polarité planaire. Cette étude nécessitera certainement une approche de microscopie sur des cryptes en culture, approche actuellement envisageable au vu des résultats de l'équipe de H. Clevers, qui a très récemment montré la possibilité de maintenir des cellules souches fonctionnelles pendant cinq jours.

# Annexe 1 : Caractérisation des Réseaux de Gènes Impliqués dans l'Orientation du Fuseau

Julien Bellis, Jan De Mey, Michel Bellis

## Introduction

Depuis quelques années se développent un ensemble de méthodes d'études regroupées sous les noms de 'Biologie des Systèmes' ou de 'Biologie Intégrative'. Leur objectif est de construire des modèles réalistes de systèmes complexes, intégrant un ensemble important de données quantitatives, le plus souvent issues de techniques à "haut débit", et décrivant différents niveaux de la réalité. Très souvent ces modèles englobent une description mathématique permettant d'effectuer des simulations. Un des exemples le plus abouti est l'étude du développement de l'oursin réalisée par l'équipe de Davidson (Istrail *et al.*, 2007). Il existe aussi de tels modèles pour le cycle cellulaire qui ont permis de mettre en évidence des phénomènes nouveaux chez la Levure (Chen *et al.*, 2004).

En ce qui concerne la polarité cellulaire, des modèles mécaniques ont été développés par diverses équipes (Nédélec, 2002) mais elles font intervenir un petit nombre de constituants, principalement les microtubules, des caractéristiques biophysiques comme la rigidité corticale, et des entités non définies au niveau moléculaire que sont les générateurs de forces. Ces modèles ne présentent donc pas un tableau complet de ce phénomène, et ne décrivent pas tous les acteurs, protéines et gènes, ainsi que les divers types de régulation susceptibles de contrôler leur action. Outre la difficulté qu'il y aurait à construire un tel modèle exhaustif, un des problèmes majeurs réside dans la connaissance très partielle que nous avons des différentes protéines jouant un rôle dans ce phénomène, protéines qui sont difficiles à caractériser car certaines, comme la dynéine, possèdent plusieurs fonctions.

Une des techniques à haut-débit qui est souvent mise à contribution en biologie des systèmes est la transcriptomique qui permet de mesurer le niveau d'expression des gènes dans une condition biologique déterminée. L'analyse en masse de ce type de données a ouvert la voie à une quantification de la corrélation moyenne existant entre les niveaux d'expression ou les variations des gènes pris deux à deux dans un vaste ensemble de conditions biologiques (Lee *et al.*, 2004). Ces matrices de corrélation entre gènes peuvent être visualisées sous forme d'un réseau de transcription dans lequel les gènes, représentés par les noeuds du réseau, sont liés entre eux par les corrélations existantes, représentées par une arrête valuée et non orientée joignant les deux noeuds correspondant (pour exemple, voire la figure A-3 page 156). Une des applications de ces réseaux est justement la recherche de candidats partenaires d'un gène connu. Un exemple démonstratif est la découverte d'un nouveau partenaire de BRCA1 et BRCA2 par un ensemble d'équipes ayant appliqué cette approche bioinformatique (Pujana *et al.*, 2007). Nous avons voulu

faire un travail similaire afin de comprendre comment s'organisent les gènes connus participant à la mise en place de la polarité cellulaire et de rechercher de nouveaux partenaires pour ces gènes.

## Utilisation des Réseaux de Transcription

### Construction de Réseaux Transcriptionnels

#### Principe de Construction

Les puces à ADN utilisées dans le contexte des études du transcriptome permettent de faire une estimation, soit du niveau d'expression dans une condition biologique, soit de la variation du niveau d'expression entre deux conditions biologiques, de chacun des gènes représentés sur la puce. Deux grandes méthodologies sont en présence qui se distinguent à la fois par le mode de fabrication, la mise en œuvre et le type de signal produit. Un premier groupe comprend les techniques dites à 'double canal' qui mesurent le niveau d'expression dans deux conditions différentes grâce à l'hybridation simultanée des deux extraits d'ARNm marqués avec des fluorochromes différents. Le signal est ensuite traité pour délivrer le signal utile qui représente une variation d'expression exprimée sous forme d'un ratio ou 'fold change' (Schena *et al.*, 1995). Ce mode d'utilisation de la puce est dicté par des considérations technologiques : en général, les puces de ce type sont produites avec des méthodes artisanales, dans des plate formes localisées dans une Université ou un Institut, qui ne permettent pas d'obtenir une densité de sondes homogène sur toute la surface. En conséquence l'estimation du niveau d'expression subit un effet de position et est donc biaisée. Seule la mesure d'un ratio permet d'éliminer en partie ce biais positionnel. Au contraire les puces 'simple canal', fabriquées dans un contexte industriel, ont une bien meilleure qualité de ce point de vue, et sont en mesure de délivrer une estimation du niveau d'expression dans une seule condition biologique (Lipshutz *et al.*, 1999). La construction de réseaux de transcriptions nécessite l'analyse et la comparaison d'un grand nombre d'expérimentations réalisées en règle générale dans des laboratoires différents. La qualité finale des réseaux générés dépendra donc de manière cruciale de la capacité de la méthode de construction choisie à réduire la variance inter-laboratoire des résultats utilisés. Une analyse des principaux facteurs pouvant intervenir de manière favorable dans ce processus de réduction montre que :

- Plus le nombre d'étapes du processus (préparation des cibles, conditions d'hybridation et de lavage, acquisition et traitement du signal, recherche des variations significatives) est grand, meilleure est la reproductibilité entre laboratoires (Bammer *et al.*, 2005). Ce constat avantage les plate-formes produites par l'industrie, et particulièrement celle d'Affymetrix, car la plupart des laboratoires qui l'emploient sont obligés d'utiliser des protocoles et des instruments identiques du début à la fin

du processus.

- Le résultat recherché dans ce genre d’analyse en masse et le calcul de corrélations positives et négatives entre tous les gènes étudiés, pris deux à deux. Les études systématiques de reproductibilité entre laboratoires montrent que la variation du signal entre deux conditions biologiques est beaucoup plus fiable que le signal lui-même (Kuo *et al.*, 2002; Irizarry *et al.*, 2005). Il est donc préférable de mesurer des corrélations entre des mesures de variation (co-variation), plutôt qu’entre des niveaux d’expression (co-expression). Les techniques à double canal qui mesurent directement des variations sont donc avantagées par rapport aux techniques à simple canal si l’on se contente d’utiliser ces dernières pour mesurer la co-expression des gènes.
- La standardisation des sondes déposées sur la puce est essentielle pour faciliter les comparaisons provenant de laboratoires différents. En effet si certains gènes ne sont pas présents sur toutes les puces rassemblées, ils ne pourront pas participer au calcul des corrélations. D’autre part, un gène peut être présent sur deux modèles de puces différents mais par l’intermédiaire de sondes dont les séquences sont très différentes et dont les résultats ne seront peut être pas comparables. De ce point de vue, les plate-formes commerciales ont un avantage indiscutable car il existe un nombre réduit de modèles différents qui sont utilisés par un très grand nombre de laboratoires au contraire des puces produites localement dont la diversité est énorme mais dont chaque modèle particulier est utilisé par un petit nombre de laboratoires. La grande diffusion des puces Affymetrix permet de rassembler une masse importante de résultats qui satisfont parfaitement cette contrainte : sur le site GEO environ un tiers des 300 000 résultats disponibles proviennent de cette technologie (Gene Expression Omnibus, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>)

Au vu de ces résultats très généraux, nous avons décidé d’utiliser les résultats obtenus avec des puces Affymetrix qui satisfont les premier et troisième critères examinés ci-dessus. Cependant, comme rappelé plus haut, cette technique délivre une mesure de niveau d’expression et toutes les constructions de réseaux transcriptionnels publiées à ce jour et basées sur l’utilisation de ce type de données ont utilisé des mesures de co-expression. Pour satisfaire également le deuxième critère de qualité, nous avons mis au point une méthode originale qui génère de manière systématique des mesures de co-variation entre toutes les conditions biologiques rassemblées, prises deux à deux (Martin *et al.*, 2004; Hennetin & Bellis, 2006). Une autre originalité de notre méthode est la construction de scores de corrélation positif et négatif entre gènes qui ne sont pas basés, comme c’est habituellement le cas dans ce type de démarche, sur l’utilisation du coefficient de corrélation de Pearson ou de méthodes apparentées. Ces méthodes ne permettent de détecter, pour un couple de gènes donné, au mieux qu’un seul type de corrélation, soit positive soit négative, lorsque les deux gènes sont régulés de manière comparable dans

l'ensemble des conditions biologiques prises en compte. Or il n'est pas difficile d'imaginer que deux gènes puissent être régulés de manière parallèle dans un ensemble de conditions biologiques, et de manière inverse dans un autre contexte (Li, 2002). Dans ce cas précis le coefficient de Pearson est très sensible à ce comportement contradictoire et ne détecte aucune corrélation, au contraire du score que nous avons développé.

## Résultats

Nous avons utilisés des données récupérées sur le site GEO en Octobre 2004 et, ne conservant que les plate-formes pour lesquelles plus de 100 résultats étaient disponibles, nous avons construit quatre réseaux transcriptionnels concernant trois espèces (nous avons utilisé respectivement pour l'homme, la souris et le rat les puces HG-U95, HG-U133, MG-U74v2 et RG-U34). Signalons pour la bonne compréhension de la suite qu'un gène est représenté, sur une puce Affymetrix, par un ou plusieurs jeux de sondes ('probe sets' que nous contractons en probeset). Les données ont été filtrées par plusieurs techniques de contrôle de qualité, que nous ne décrivons pas ici, afin d'éliminer les données douteuses qui auraient pu dégrader de manière importante la fiabilité des résultats finaux. Pour démontrer la validité des résultats obtenus, nous avons eu recours à plusieurs approches. Premièrement nous avons montré que la topologie des quatre réseaux était conservée (le voisinage d'un probeset, c'est-à-dire l'ensemble des probesets qui lui sont directement corrélés, est très similaire d'un réseau à l'autre). Ensuite nous avons développé une technique de représentation en 3D de ces réseaux, en assimilant respectivement les corrélations positive et négative a des forces d'attraction ou de répulsion. La encore le voisinage d'un probeset, cette fois défini comme l'ensemble des probesets situés à l'intérieur d'une boule centrée sur lui, est similaire. Enfin nous avons comparé les réseaux à une échelle plus large et montré, grâce à une méthode de clustering dite de Markov (Enright *et al.*, 2002), que les réseaux étaient tous constitués de six grandes régions constituées chacune d'environ mille gènes ou plus. L'application de techniques de clustering sur les termes de Gene Ontology (GO, (Ashburner *et al.*, 2000)) attachés à ces gènes nous a permis de montrer que chaque région était très homogène et pouvait être décrite par une fonction très générale. Afin d'établir une description de chaque region, nous avons sélectionné les cinq termes les plus significatifs dans chacune des trois branches de GO (càd biological process, molecular function et cell component) et construit, pour les régions une à six, les descripteurs suivant en utilisant un terme représentatif pour chaque branche :

1. immune system / signal transduction / lysosome
2. nucleic acid metabolic process / nucleic acid binding / nucleus
3. cell adhesion / extracellular matrix structural constituent, extracellular matrix
4. energetic metabolism / NADH dehydrogenase activity, mitochondrion
5. nervous system / ion channel activity / neuron

## 6. metabolism / oxidoreductase activity / endoplasmic reticulum

C'est ainsi que nous avons défini les régions 1 à 6 comme étant respectivement impliquées dans l'immunité, les phénomènes nucléaires, l'adhésion cellulaire, le métabolisme énergétique, le système nerveux et le métabolisme général (anabolisme et catabolisme). Il faut souligner que de nombreux gènes de la région 3 sont des acteurs importants du développement et de la morphogénèse.

La figure 1 montre sous forme d'un codage de couleur, la valeur des corrélations positive et négative existant entre tous les probesets, pris deux à deux, constituant ces six régions. Ce résultat de portée générale n'est pas si trivial qu'il en a l'air car les études publiées à ce jour sur le sujet délimitent des régions dont le principal défaut est qu'elles ont des degrés de généralité assez disparates (par exemple une région caractérisée par une fonction très générale comme l'immunité coexistera avec une région très spécialisée comme le protéasome), et qu'une même fonction est représentée par plusieurs régions. Une explication de ce phénomène est que l'utilisation du coefficient de Pearson conduit à la construction de réseaux ayant peu de liens ce qui favorise la scission des régions que nous avons définies en plusieurs entités plus petites et plus spécialisées.

Un des résultats obtenus au cours de cette étude est la mise en évidence du caractère non symétrique des corrélations inter- et intra-régionales. Rappelons que les quatre réseaux sont construits à partir de conditions biologiques différentes. Mais, alors que les corrélations intra-régionales, qui sont des corrélations positives, sont très reproductibles, ce qui a permis de définir la structure commune aux quatre réseaux construits, il n'en est pas de même des corrélations inter-régionales qui montrent une grande sensibilité à la nature des conditions biologiques utilisées. En résumé, la structure générale des réseaux construits est gouvernée d'une part par des corrélations positives fortes ayant une très grande généralité car elles sont observées dès lors que les conditions biologiques prises en considération sont suffisamment variées, et d'autre part par des corrélations positives et négatives faibles, dépendantes des conditions biologiques utilisées, qui sont responsable de la position relatives des régions les unes par rapport aux autres comme indiqué dans la figure A-2 page 154.

## Interrogation d'un Réseau Général

L'information codée dans les matrices de corrélation, et visualisée de manière très synthétique sous forme de réseaux transcriptionnels, est imposante par sa richesse et sa complexité. Exploiter cette information pour en tirer de nouvelles connaissances représente un défi de taille pour le biologiste. Par exemple, le réseau de souris que nous allons prendre maintenant comme exemple, est constitué de 12 488 probesets et de  $8.10^6$  corrélations significatives qui résultent de la comparaisons de 89 conditions biologiques entre elles (soient  $3916 \text{ comparaisons} \times 12 \text{ 488 probesets} = 48.10^6$  calculs de variations et  $12 \text{ 488} \times 12 \text{ 488} = 156.10^6$  calculs de corrélation entre probesets).

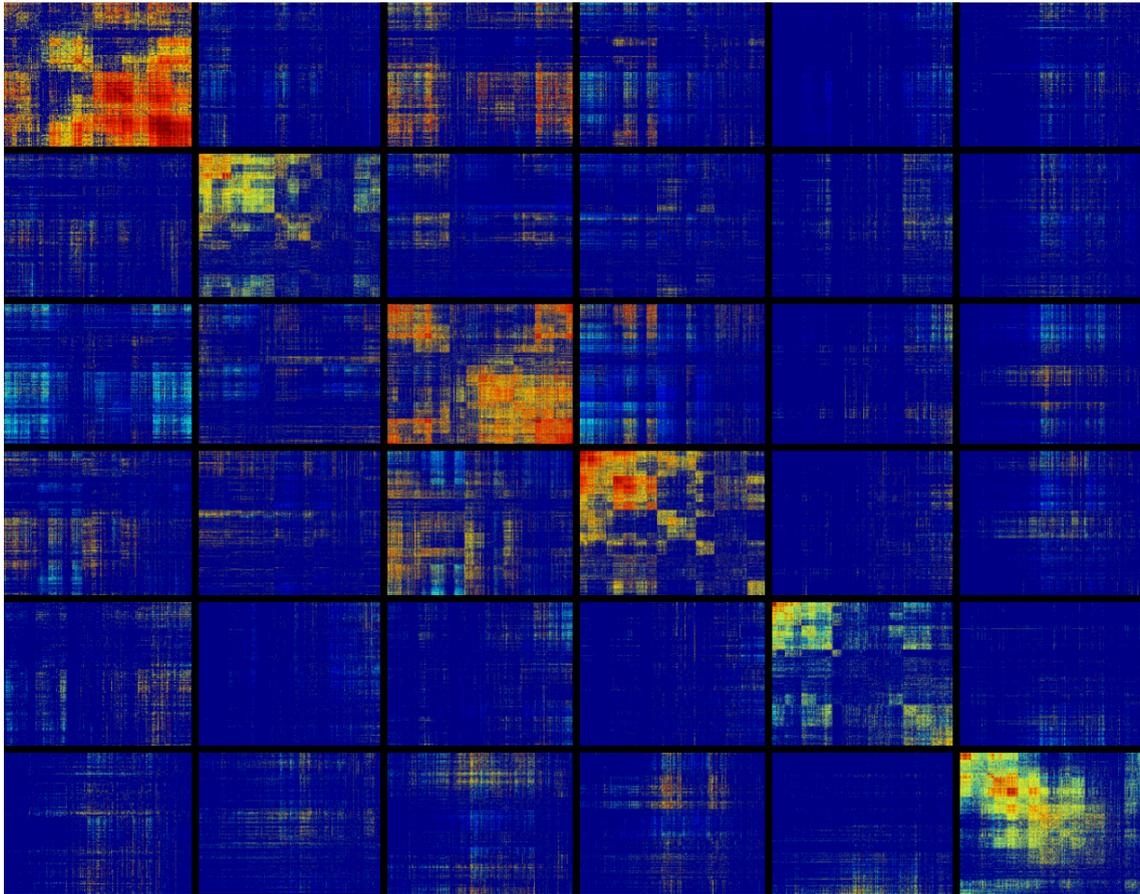


FIGURE A-1 – Représentation graphique des scores de corrélation positive et négative à l’intérieur et entre les six régions des réseaux transcriptionnels de la puce MG-U74v2 (souris)

Les six régions sont représentées sur la diagonales principale et comprennent du coin gauche supérieur au coin droit inférieur les régions impliquées respectivement dans l’immunité, les phénomènes nucléaires, l’adhésion cellulaire, le métabolisme énergétique, le système nerveux et le métabolisme général (anabolisme et catabolisme). Dans ces régions seules les corrélations positives sont représentées -les matrices correspondantes sont donc symétriques- après l’application d’un algorithme de clusterisation qui fait apparaître une structure en modules chevauchants. En dessus et en dessous de cette diagonale principale sont représentées respectivement les corrélations positives et négatives entre les régions. Chaque point représente une valeur de corrélation pour un couple de probesets dont les projections sur l’axe des abscisses et l’axe des ordonnées donnent l’identité de chaque probeset. Les couleurs représentent l’intensité de corrélation et varient du bleu pour une corrélation faible au rouge pour une corrélation forte en passant par le jaune et le vert.

Dans cette partie nous détaillons les principaux fichiers et représentations graphiques qui sont générés automatiquement et qui sont intégrés dans un logiciel de manipulation de concept (FREEMIND, <http://freemind.sourceforge.net/wiki/index.php/Screenshots>) permettant au biologiste de naviguer sans effort entre les documents et de lancer les applications nécessaires à l’interrogation plus poussée des résultats (par ex. CYTOSCAPE, <http://www.cytoscape.org/features2.php>).

Nous avons sélectionné d’après la littérature une liste de 118 gènes connus pour jouer

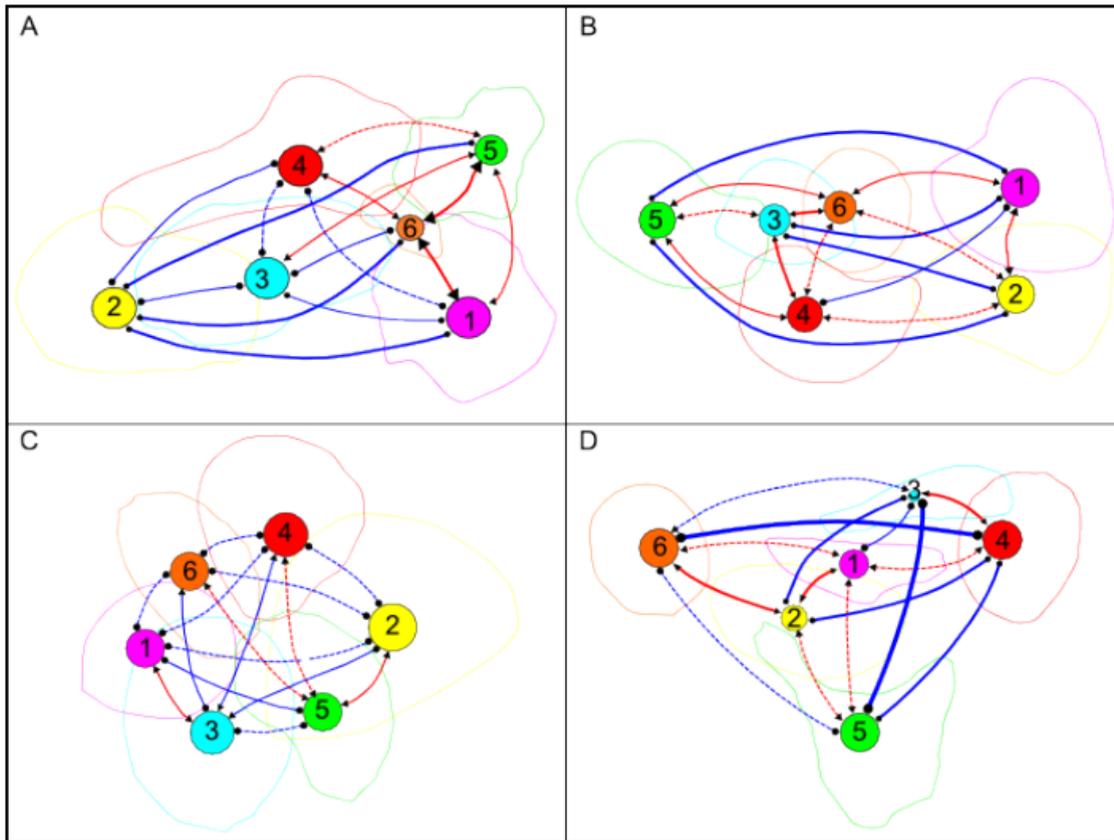


FIGURE A-2 – Représentation graphique de la structure générale des quatre réseaux construits

Les six régions sont représentées à la fois par une courbe colorée fermée délimitant son extension maximale et par un point de même couleur situé au barycentre de tous les probesets qui la constituent (projection sur une surface du modèle 3D évoqué dans le texte). Les régions sont reliées entre elle par une arête dont la couleur rouge ou bleue indique que les corrélations existantes entre les probesets des deux régions reliées sont respectivement majoritairement positives ou négatives et dont l'épaisseur plus ou moins grande indique la force moyenne des corrélations majoritaire. A : HG-U95 (homme), B : HG-U133 (homme), C : MG-U74Av2 (souris), D : RG-U34 (rat).

un rôle dans le système biologique que nous avons pris pour modèle, le cancer du côlon, étudié sous l'angle de la caractérisation des cellules souches de la crypte du colon et de la mise en place de la polarité cellulaire planaire. Parmi ces 118 gènes nous avons individualisé 12 gènes clefs qui semblent le plus directement liés à la polarité cellulaire, dont huit (FZD3, GNAI2, LLGL1, LLGL2, NUMA1, PARD3, RIC8 et STK11) sont sur la puce MG-U74Av2 que nous prenons ici pour exemple. L'étude, dans le contexte du réseau transcriptionnel, de deux probesets ciblant le même gène montre parfois que leur voisinage est complètement différent ce qui nous a conduit à les distinguer et à définir des transcrits virtuels (groupe de probesets ayant le même voisinage et dont on fait l'hypothèse qu'il ciblent un ou des transcrits communs) que nous appellerons par la suite simplement transcrits. Sur la puce MG-U74Av2 nous décomptons 78 gènes, codant pour 81 transcripts, et représentés par 123 probesets. Eu égard à la proximité du nombre de

gènes et du nombre de transcrits, l'on parlera par la suite parfois de gènes en faisant référence en réalité à des transcrits.

### **Visualisation de la Structure du Sous-Réseaux des 78 gènes**

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à la structure du sous-réseau constitué des 78 gènes présents sur la puce MG-U74Av2 (correspondant à 81 transcrits). Ce sous-réseau est structuré en groupes défini par l'application du clustering de Markov déjà utilisé pour définir les régions. Nous obtenons ainsi 16 groupes de tailles très inégales : 34 transcrits sont dans le premier groupe alors que les 15 autres groupes ont de 1 à 5 transcrits (12 transcrits ne sont pas groupés par cet algorithme et correspondent à des probesets qui ne sont pas dans une région). Sur la représentation graphique du sous-réseau, dans la figure A-3 page suivante, nous constatons que les transcrits du premier groupe appartiennent majoritairement à la région 3 (adhésion : 29 transcrits, colorés en cyan) et dans une moindre mesure à la région 2 (noyau : 8 transcrits, colorés en jaune) et sont reliés entre eux par des corrélations positives (traits rouges) alors que les transcrits des autres groupes appartiennent principalement à la cinquième région (système nerveux : 11 transcrits, colorés en vert) et un peu à la quatrième région (métabolisme énergétique : 6 transcrits, colorés en rouge) et sont corrélés négativement avec les transcrits du premier groupe (traits bleus). Dans leur ensemble, la majorité des transcrits appartiennent à la région 2 (adhésion) avec 29 transcrits sur les 56 qui sont groupés par l'algorithme de Markov.

Nous avons utilisé le même type de représentation pour décrire les relations existant entre les gènes clefs. La figure A-4 page 157 montre que les gènes FZD3, LLGL1, NUMA1, RIC8 et STK11 ont peu de corrélation avec les autres gènes de notre liste et que seuls GNAI, LLGL2 et PARD3 sont intégrés dans un réseaux de relations complexe. On peut distinguer dans ce réseau deux quasi-cliques (c'est à dire un ensemble de gènes qui sont presque tous reliés deux à deux par des corrélations positives) qui ont des relations antagonistes : la première quasi-clique comprend GNAI, LLGL2, PARD3 et un grand nombre de gènes dont seuls quelques uns sont représentés sur la figure A-4 page 157 (noter toutefois que LLGL2 et GNAI sont corrélés négativement) et la seconde quasi-clique est constituée des gènes TP53, TUBA5, TUBA6, TUBB2 et TUBB3. Un autre groupe de gènes indépendants, comprenant entre autres PFN1, ACTN, ACTA et CDH sont fortement corrélés négativement à la première quasi-clique. A l'intérieur de ce complexe, LLGL2 se distingue par le rôle central qu'il semble jouer à la fois dans les corrélations positives et les corrélations négatives.

### **Relation avec les autre Gènes. Définition de clusters**

Le réseau transcriptionnel est cette fois utilisés dans son ensemble pour comprendre quelles sont les relations des gènes d'intérêt avec tous les autres gènes du réseau. Une

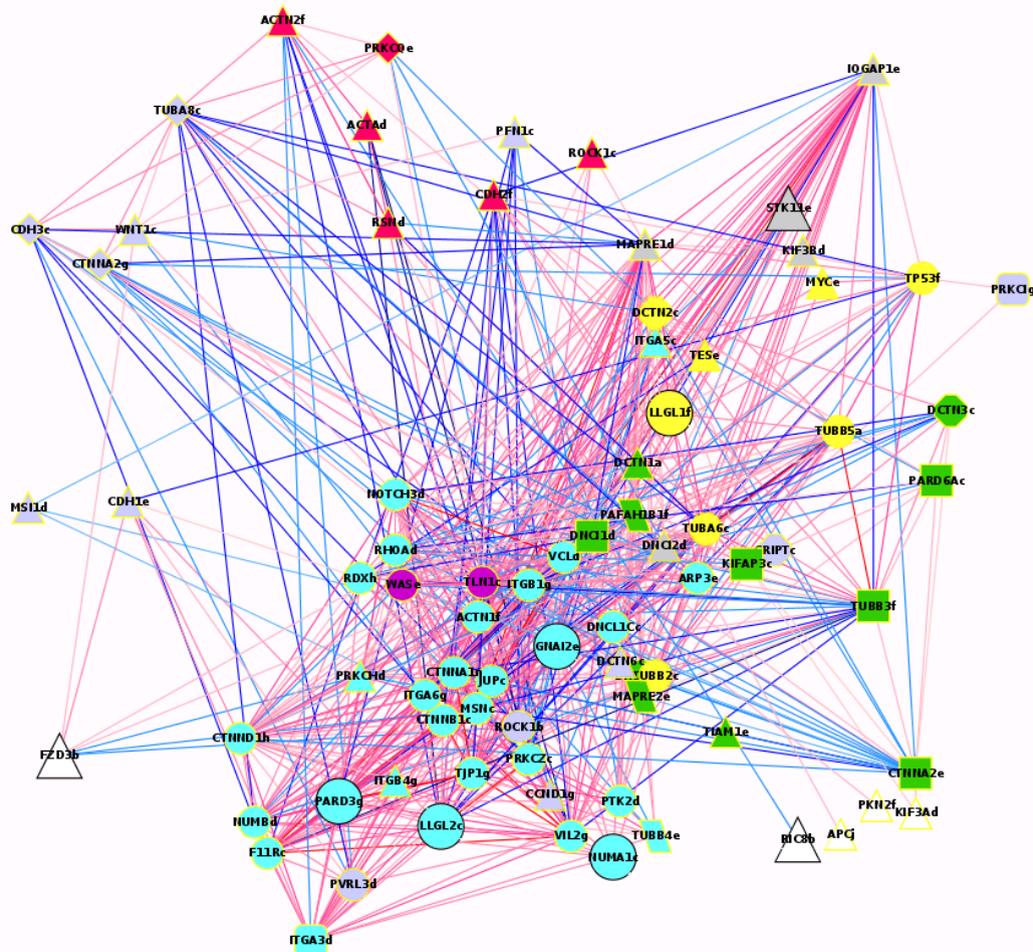


FIGURE A-3 – Représentation graphique du sous réseau de 78 gènes

Chaque symbole représente un transcrite, comme défini dans le texte, dont le nom est formé par concaténation du nom du gène correspondant et d'une lettre minuscule permettant de distinguer les transcrits d'un même gène (ces lettres concernent les quatre réseaux et de ce fait la présence d'un transcrite avec la lettre b n'implique pas qu'il en existe, sur ce réseau, un autre avec la lettre a). La forme des symboles indique le groupe auquel appartient le transcrite correspondant (rond, carré, losange, parallélogramme, octogone, carré arrondi pour les groupes 1 à 6 et triangle pour les groupes de rang supérieur). La couleur des symboles indique leur appartenance aux régions 1 à 6 définies dans le texte, et respectivement colorées en violet (immunité), jaune (noyau), cyan (adhésion), rouge (métabolisme primaire), vert (système nerveux) et orange (métabolisme général, sans représentant ici). Les symboles vides ou colorés en gris ou en mauve correspondent à différentes catégories qui ne sont pas incluses dans les régions. Les symboles de plus grande taille, bordés de d'un trait noir, indiquent les gènes clés que nous avons définis comme plus étroitement impliqués dans la polarité (FZD3, GNAI2, LLGL1, LLGL2, NUMA1, PARD3, RIC8 et STK11). Les liens sont colorés en bleu et rouge pour indiquer respectivement des corrélations positives et négatives avec une gamme allant du plus clair au plus foncé pour indiquer la force de la corrélation.

représentation telle que celle employée dans les figures A-3 et A-4 page suivante serait difficilement lisible et nous avons mis en oeuvre un autre concept pour l'affichage de ces relations. A partir des matrices de corrélations positive (P) et négatives (N), nous cal-

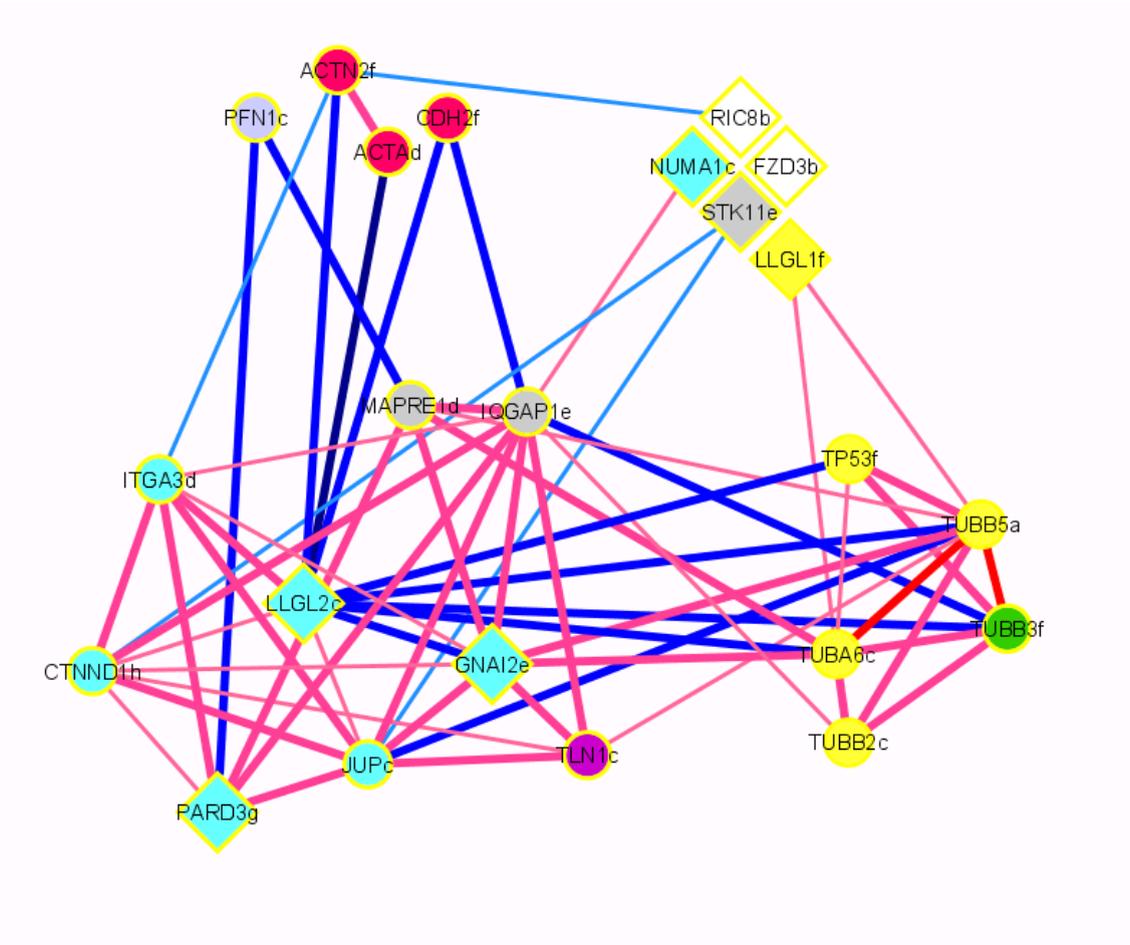


FIGURE A-4 – Représentation graphique du sous-réseau des 8 gènes clés

Les couleurs des symboles ont la même signification que dans la figure A-3 page précédente. Les losanges de plus grande taille indiquent les gènes clés (FZD3, GNAI2, LLGL1, LLGL2, NUMA1, PARD3, RIC8 et STK11). L'épaisseur des liens est proportionnelle à leur intensité (les corrélations positives et négatives sont colorées respectivement en rouge et bleu).

culons une matrice de différences (P-N) dont nous extrayons une sous-matrice de taille  $I \times N$  (où  $I$  est le nombre de probesets d'intérêt, soit 123, et  $N$  est le nombre de probesets dans le réseau, soit 12 488). Cette sous-matrice est analysée par le logiciel CLICK qui calcule un regroupement des probesets du réseau en plusieurs clusters disjoints. La figure A-5 page suivante représente graphiquement les valeurs positives (CORR) et négatives (ANTI) de la sous-matrice  $I \times N$ , une fois qu'elle a été ordonnée par le processus de clustering qui concerne les probesets représentés en abscisse, alors que les probesets d'intérêt représentés en ordonnées ont eux été ordonnés selon les groupes définis au chapitre précédent.

Il existe bien sûr une cohérence entre cette représentation particulière et celle utilisée dans les figures A-3 page précédente et A-4. Ainsi le groupe numéro 3 (CDH3, CTNNA2, TUBA8 et WNT1), qui est corrélé positivement avec des gènes du métabolisme énergétique sur la figure A-3 page précédente, est également corrélé positivement avec les

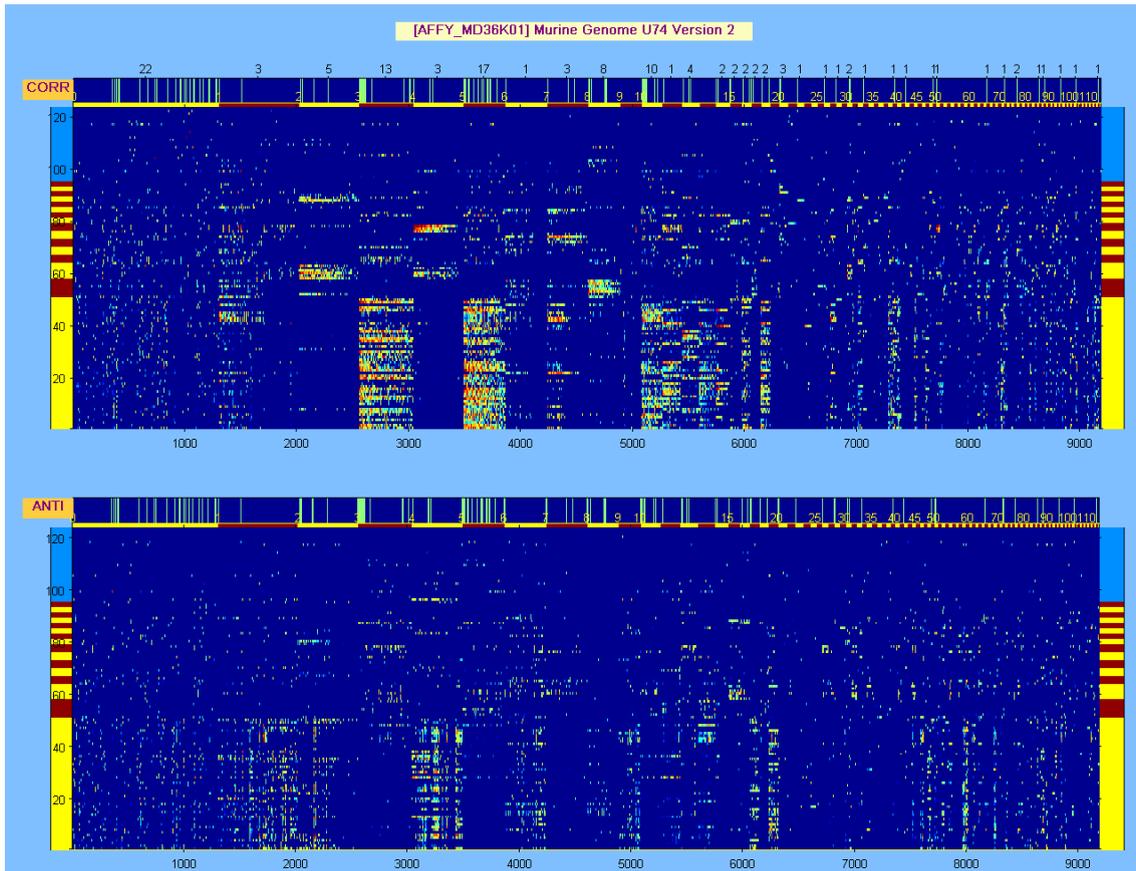


FIGURE A-5 – Représentation graphique des corrélations positives et négatives après arrangement des probesets selon l'ordre des clusters, en abscisses, et selon l'ordre des groupes de probesets d'intérêt, en ordonnées

Le panneau du haut présente les valeurs de corrélation positive (CORR) et celui du bas les valeurs de corrélation négative (ANTI). Une gamme de couleurs allant du bleu foncé au rouge sombre, en passant successivement par le cyan, le vert, le jaune et l'orange, représente les valeurs qui s'étendent de 0 (bleu) à 100 (rouge). Sur l'axe des ordonnées, une barre verticale, représentée par une alternance de surfaces jaune et bistre, représente, par une alternance de surfaces jaune et bistre, les 16 groupes de probesets d'intérêt définis par application du clustering de Markov (cf. chapitre précédent). Le groupe numéro 1 est positionné à la base, suivi, en remontant, du numéro 2 etc. Au dessus des panneaux, parallèlement à l'axe des abscisses, une barre, par une alternance de surfaces jaune et bistre, indique les différents clusters calculés par CLICK. Le premier cluster de la barre horizontale, à l'extrême gauche, représenté en jaune, et le dernier groupe de la barre verticale, en haut, représenté en bleu, contiennent les probesets qui n'ont pas été intégrés du fait de leur quasi absence de corrélation avec les autres probesets. Au dessus des panneaux, des traits verticaux de couleur verte indiquent la position des probesets d'intérêt dans les différents clusters avec, indiqué au dessus, leur nombre.

clusters numéro 2 et 4. Or le cluster numéro 4 est composé à 90% de gènes de la région 4 (métabolisme énergétique) et de 10% de gènes de la région 6 (métabolisme). Quant au cluster numéro 2, la majorité de ses membres ne sont pas classés dans une quelconque région, mais 80% de ses gènes qui sont classés dans une région le sont dans la région 4, indiquant qu'il s'agit d'un cluster homogène dont les membres 'gravitent' aussi autour de la région 4. On remarque également que les probesets du groupe 1 sont corrélés négati-

vement avec les probesets du cluster 4, en accord avec la figure A-3 page 156 où tous les gènes appartenant à la région 4 (PFN1, ACTN, ACTA et CDH) sont fortement corrélés négativement avec un grand nombre de gènes du groupe 1. De même les probesets du groupe 1, qui étaient fortement corrélés positivement entre eux et ciblaient majoritairement des gènes de la région 3 (adhésion) sur la figure A-3 page 156, sont, sur la figure A-5 page précédente, corrélés positivement au cluster numéro 3 qui est constitué presque exclusivement de probesets de la région 3. Enfin la figure A-1 page 153 montre bien qu'il existe un grand nombre de corrélation négatives entre les probesets de la région 3 et ceux de la région 4. Tout cela indique que le processus de clustering par CLICK est en grande partie contraint par la structure à grande échelle du réseau, telle que nous l'avons définie, en six régions, ce qui explique la très grande homogénéité des clusters produits.

La partition des gènes en clusters permet de se focaliser sur un plus petit nombre de gènes candidats. Si l'on recherche par exemple des gènes d'adhésion corrélés positivement à LLGL2 qui, d'après la figure A-4 page 157, semble jouer un rôle central, le choix se restreint aux clusters 3, 12, 13, 44, 46 et 93. En imposant la condition supplémentaire d'appartenance à la région 3 (adhésion) seuls les clusters 3 et 12, contenant respectivement 483 et 156 probesets, seront à considérer. Afin de présenter ces probesets dans un ordre convenable, nous déterminons quels sont les probesets d'intérêt qui sont corrélés positivement avec l'ensemble des probesets du cluster et nous calculons la corrélation positive moyenne de chaque probeset du cluster avec ces probesets d'intérêt. Les probesets du cluster sont ensuite arrangé de manière décroissante en fonction de cette moyenne, comme montré pour le cluster 12, dans la figure A-6 page suivante, plaçant en tête de liste les gènes potentiellement les plus significatifs. On trouve dans cette liste des gènes bien connus pour être spécifiques de l'adhésion comme la keratine 18, la périplakine et l'occludine ou un gène codant pour l'intégrine alpha 3. Il est plus intéressant d'y trouver le gène cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 1 qui est l'homologue de Flamingo, une cadherine impliqué dans la voie PCP, ainsi que des gènes codant pour le moteur moléculaire myosin VI. Un autre gène nous paraît tout à fait intéressant : la glutathione peroxidase 2. Les gènes glutathione peroxydase 1 et 2, qui codent pour les protéines Gpx1 et Gpx2, jouent un rôle important au sein de l'intestin. En effet leur délétion conduit à une iléocolite, c'est à dire une inflammation simultanée de l'iléon, de la partie terminale de l'intestin grêle et du côlon que l'on rencontre dans la maladie de Crohn et qui peut déboucher sur un cancer (Lee et al., 2006).

L'utilisation d'une représentation interactive du réseau dans CYTOSCAPE permet de retrouver facilement les partenaires qui interagissent avec un gène d'intérêt particulier (voir figure A-7 page 161) et d'activer des liens Internet pour compléter les informations les concernant (dans la version actuelle les informations de Gene Ontology sont disponibles directement et il est possible de se connecter à Ensembl ou à GeneCard. Nous pouvons rajouter facilement autant de liens que nécessaire, par exemple pour se connecter

à iHOP (<http://www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/>) qui référence tous les résumés d'articles contenant le nom d'un gène ou d'une protéine, ou à IntAct (<http://www.ebi.ac.uk/intact/site/index>) qui référence les interactions connues entre protéines.

CLU	PS RANK	SYMBOL	DEFINITION	Y-PS GRP		Y-GENE GRP			
				CORR	ANTI	CORR	CLU	SYMBOL	CLU
12	3346	Fxyd3	FXYD domain-containing ion transport regulator 3	32,31	13,17	CTNND1	1	ITGA3	1
12	6273	AA409316	expressed sequence AA409316	30	11,33	CTNND1	1	ITGA3	6
12	3965	Crb3	crumbs homolog 3	29,75	11,67	VIL2	1	ITP53	7
12	4990	E1f3	E74-like factor 3	29,5	3,67	F11R	1	ACTA	8
12	858	Krt18	keratin 18	28,89	2,5	NUMA1	1	ACTN2	8
12	6948	A130010J15Rik	interferon regulatory factor 6	28,38	-4,83	PRKCZ	1	VCL	15
12	5686	Ppl	periplakin	28,19	7,83	TCF7	1		
12	3565	Tacstd2	tumor-associated calcium signal transducer 2	28,19	15,5	PVRL3	1		
12	12297	Wbsol25	Williams Beuren syndrome chromosome region 25	28	4,83	NUMB	1		
12	4986	St6galnac2	ST6	27,83	8,5	LLGL2	1		
12	1292			27,44	14,17	ITGA3	1		
12	7165	Ocln	occludin	26,06	-6	PAR3	1		
12	7382			26,06	-0,83	TUBB4	4		
12	3041	Tuft1	tuffelin 1	25,38	0,33	ITGA3	6		
12	5601	Lig12	lethal giant larvae homolog 2	25,38	0,17	CDH1	14		
12	425	Tff2	trefoil factor 2	25,38	6,67	ITGB4	17		
12	4437	Prkcz	protein kinase C, zeta	25,25	-6				
12	5702	Col13a1	procollagen, type XIII, alpha 1	24,83	6				
12	8017	Gna14	guanine nucleotide binding protein, alpha 14	24,31	0,5				

FIGURE A-6 – Début de la liste des gènes du cluster 12

Dans la partie gauche sont indiqués les probesets du cluster 12 classés comme indiqué dans le texte en fonction des valeurs décroissantes de leur corrélation moyenne avec le groupe des probesets ciblant des gènes d'intérêt et corrélés positivement aux probesets du cluster (valeurs données dans la colonne CORR; le même calcul est effectué pour les probesets corrélés négativement dans la colonne ANTI). Les probesets ciblant des gènes d'intérêt sont indiqués à gauche par une case jaune. Dans la partie droite sont listés les probesets d'intérêt qui sont corrélés positivement ou négativement aux probesets du cluster. Les probesets ciblant des gènes clés sont surlignés en vert.

Finalement, il peut être utile de savoir quelles sont les conditions biologiques dans lesquelles certains gènes montrent une variation significative. Nous avons développé pour cela un outil de représentation graphique qui permet de catégoriser une condition biologique en fonction du ratio entre le nombre moyen de probesets qui varient de manière positive et le nombre moyen de probesets qui varient dans toutes les comparaisons possibles avec les autres conditions biologiques (figure A-8 page 162). Cet outil permet également de consulter facilement la liste de tous les gènes qui varient dans une comparaison donnée ou de rechercher quelles sont les comparaisons dans lesquelles un gène donné varie.

## Développements en Cours

Nous avons depuis étendu la construction de réseaux à un nombre bien plus important d'espèces et de conditions biologiques (par exemple, la puce MG-U74Av2 est représentée maintenant par environ 1000 conditions biologiques, ce qui représente 500 000 comparaisons effectuées pour construire le réseau transcriptionnel correspondant). Nous avons également, grâce à l'utilisation de la base de données AceView, précisé les groupes de transcrits réellement existant qui sont ciblés par chaque sonde d'un probeset, et pu ainsi assigner de manière rigoureuse les probesets à des groupes de transcrits.

Grâce à ce nombre accru de conditions biologiques nous testons actuellement une nouvelle stratégie basée sur la construction de réseaux spécialisés que nous appliquerons

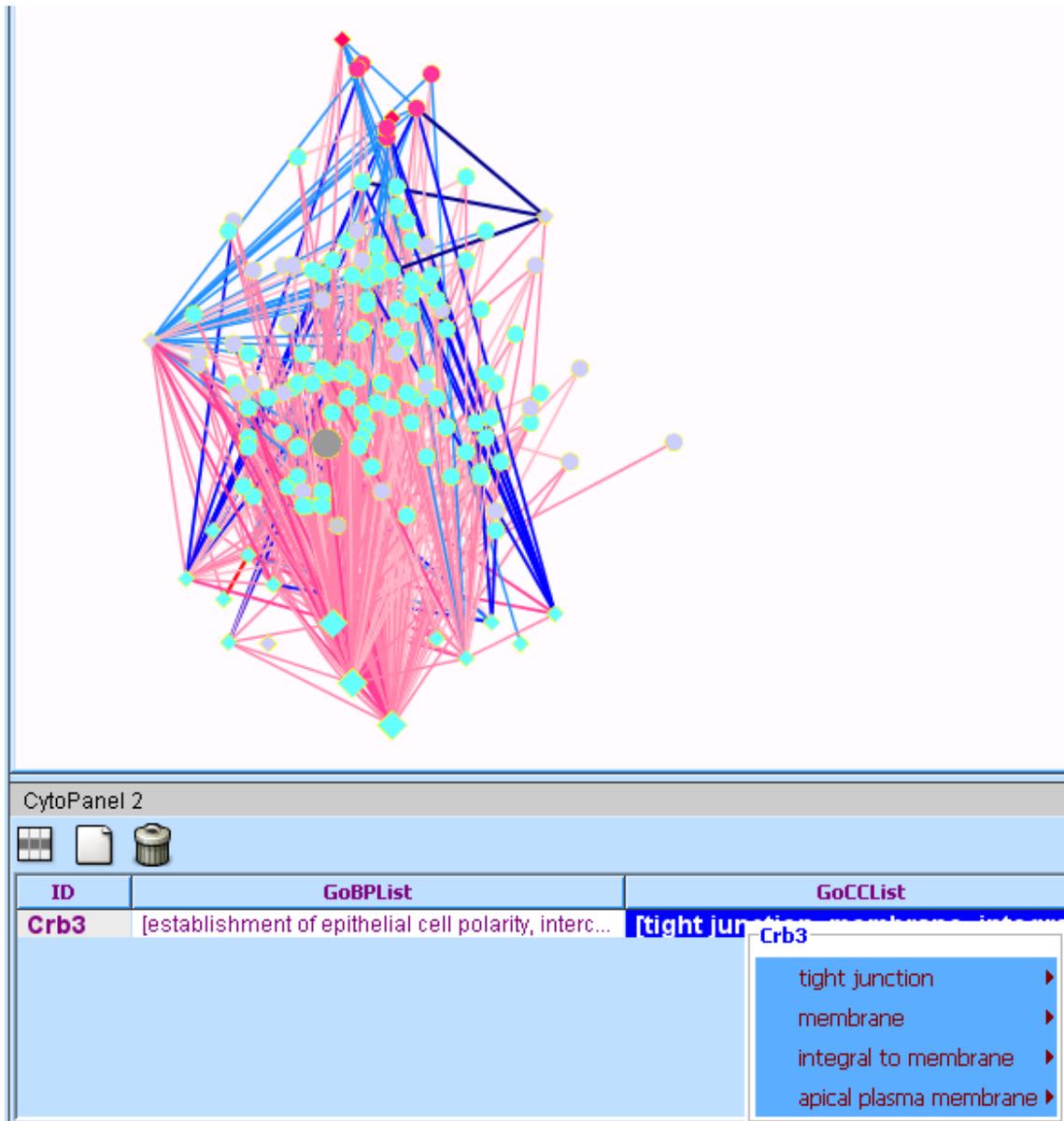


FIGURE A-7 – Représentation graphique du sous-réseau du cluster 12.

Les probesets ciblant des gènes d'intérêt sont représentés par un losange. Trois d'entre eux représentant les gènes ITGA3, ITGB4 et LLGL2 sont signalés par un symbole de plus grande taille en bas du réseau. Ces trois gènes sont reliés au gène CRB3 (rond grisé de plus grande taille au milieu du réseau) qui figure parmi les gènes en tête de liste dans le tableau de la figure A-7. En dessous du réseau, des informations multiples sont accessibles (ici l'information tirée de Gene Ontology, montrant que ce gène qui nous n'avions pas incorporé dans notre liste de gènes d'intérêt joue un rôle dans l'établissement de la polarité cellulaire)

en priorités aux gènes clefs. Pour un gène test particulier nous classons les conditions biologiques en deux groupes : le groupe des expressions faibles et le groupe des expressions fortes (ces groupes sont déterminés, par exemple, en utilisant le premier et le dernier quartile des valeurs de signaux normalisées). Cela nous permet de construire trois réseaux transcriptionnels de deux types différents : deux des réseaux caractérisés par l'absence

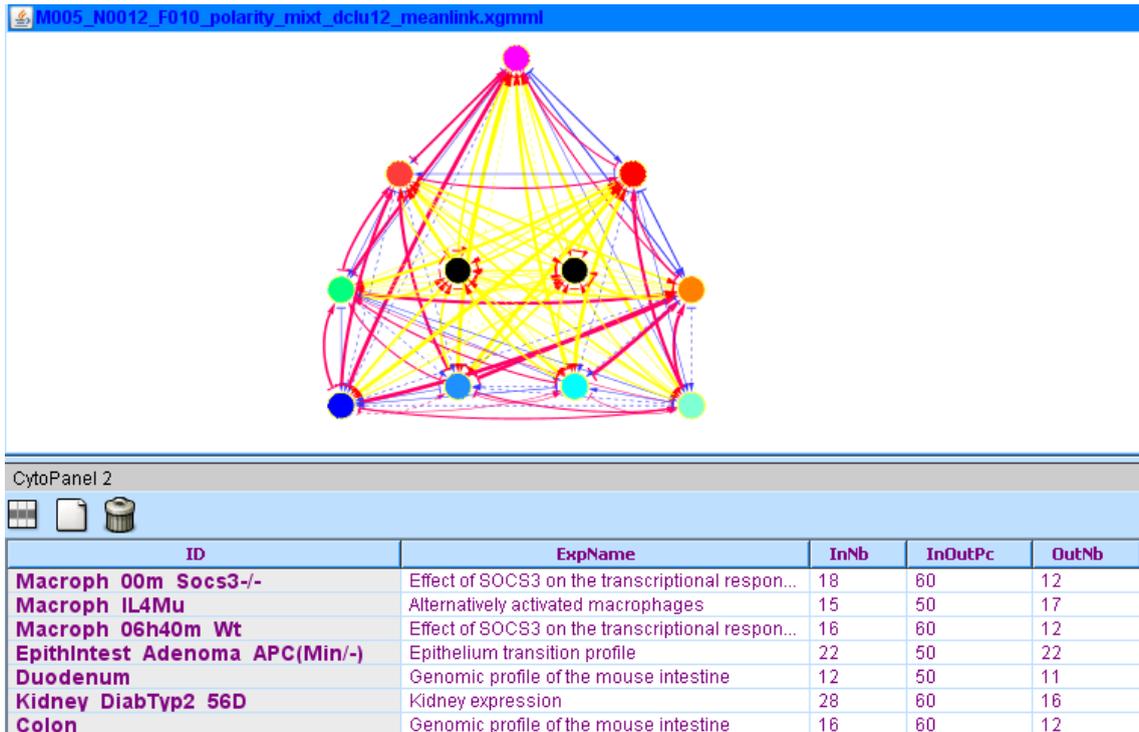


FIGURE A-8 – Catégorisation des conditions biologiques pour le cluster 12.

Pour une condition biologique donnée, par exemple celle notée 'Macroph IL4Mu' nous comptons le nombre moyen de probesets du cluster 12 qui varient de manière positive dans toutes les comparaisons possibles avec les 88 autres conditions biologiques (12, colonne InNb). Nous faisons de même pour les probesets qui varient de manière négative (18, colonne OutNb). Le pourcentage  $\text{OutNb} \times 100 / (\text{OutNb} + \text{InNb})$  discrétisé ( $15 \times 100 / 32 = 46,875 \Rightarrow 50$ , colonne InOutPc) est utilisé pour classer cette condition dans la classe 50 (les classes vont de 0 à 100, de bas en haut et de gauche à droite). Ici sont indiqués les conditions biologiques appartenant aux classes 50 et 60. La figure au-dessus du tableau montre l'arrangement des différentes classes. Les flèches bleues et rouges indiquent par leur épaisseur le pourcentage de probeset qui varient de manière positive (rouge) ou négative (bleu) entre deux classes (les classes et les liens sélectionnés sont respectivement noir et jaune).

ou une faible variation du gène test (type I) et un réseau caractérisé par une très forte variation du gène test (type II). Les comparaisons entre toutes les conditions biologiques pour lesquelles le gène test a une valeur de signal exclusivement inférieure au premier quartile, ou exclusivement supérieure au dernier quartile, donneront un réseau de type I. Les comparaisons pour lesquelles une des conditions biologiques a une expression faible et l'autre une expression forte donneront un réseau de type II. Nous pensons que les comparaisons entre ces trois réseaux nous permettront de mieux cibler les gènes candidats pouvant jouer un rôle identique ou complémentaire de celui du gène test, et ainsi de réduire la liste des gènes candidats.

## Annexe 2 : Proposition d'un système d'étude de candidats par microscopie à haut-débit

Le travail que nous avons exposé vise à découvrir *in silico* des gènes ayant une grande probabilité de jouer un rôle dans la PCP. Le cœur de cette méthode est l'utilisation des réseaux de transcription qui permettent de synthétiser une énorme quantité de données expérimentales en une représentation facilement manipulable. Bien sûr cette approche peut encore être améliorée en croisant nos résultats avec des données supplémentaires (par exemple : les maladies génétiques avec, lorsqu'ils sont connus, les gènes impliqués ou bien leur position chromosomique déduites d'analyses de liaison ou d'association; les gènes ciblés par des molécules pharmacologiques, etc.) ou en ajoutant des liens de causalité dans le réseau transcriptionnel en considérant le jeu possible entre les facteurs de transcriptions et leur sites de fixation existant en amont des gènes. En tout état de cause les listes générées devront être testées de manière expérimentale et il faut donc imaginer un système permettant de tester à grande échelle des gènes candidats.

L'étude des mécanismes gouvernant la polarité planaire souffre à l'heure actuelle de l'absence d'un modèle biologique reproduisant *in vivo* les conditions de la PCP et qui soit accessible aux techniques d'imagerie. Le développement d'un système cellulaire ayant, ne serait-ce que partiellement, certaines des caractéristiques de la PCP serait une étape majeure dans l'analyse de ses mécanismes. On peut imaginer plusieurs systèmes qui permettraient de créer artificiellement une PCP. Une des propriétés essentielles de la PCP, outre la localisation asymétrique des protéines dans la cellule, est l'organisation géométrique du tissu, que ce soit dans les cellules touffes de l'oreille interne ou dans les cellules de l'aile de la *Drosophile*. Cette propriété pourrait être reproduite par l'utilisation de micro-patron adhésif qui permettent de contrôler l'organisation des cellules entre elles. L'équipe de R. Keller a montré que la PCP était impliquée dans le dépôt polarisé de fibronectine (Goto *et al.*, 2005), démontrant par là qu'il existe une connexion entre la matrice extracellulaire et la PCP. Il serait donc intéressant d'explorer le lien de causalité existant entre ce deux phénomènes et de tester si des cellules mises en culture sur une certaine matrice sont capables de réagir en développant une PCP. Il serait alors possible par l'utilisation de micro-patron de contrôler l'organisation spatiale des cellules entre elles et d'imposer une polarité planaire. La partie "Influence de l'adhésion sur l'organisation interne de la cellule et l'orientation du fuseau mitotique" page 52 décrit l'utilisation de micro-patrons pour l'étude de cellules uniques. Il serait intéressant d'utiliser ces micro-patrons afin d'induire une organisation de type épithélium tissulaire.

Le signal qui va générer la PCP à l'échelle tissulaire n'a pas été identifié bien que l'on connaisse les gènes impliqués, au niveau cellulaire, dans la transmission de ce signal et l'établissement de la polarité planaire. Un gradient de morphogène est le mécanisme le plus probable pour imposer à l'échelle d'un tissu une polarité commune. Partant de

l'hypothèse que la PCP est effectivement déclenchée par un morphogène, on peut imaginer un système de culture avec une source diffusant ce morphogène de façon à créer un gradient permettant ainsi l'établissement d'une polarité planaire. Un autre mécanisme pourrait faire intervenir le cil primaire. En effet cette structure joue un rôle dans la polarité probablement par l'intermédiaire de certaines de ses protéines telle que l'inversine. On peut ici penser qu'un système de culture générant un flux de milieu de culture permettrait de polariser les cellules via une action sur le cil primaire.

Une deuxième nécessité dans une approche à haut-débit concerne la capacité à générer et analyser de manière automatique une quantité importante de données. Plusieurs équipes se sont attelées à étudier des problèmes biologiques en mettant en oeuvre des techniques de microscopie à haut débit sur des cellules traitées à l'ARN interférent, par exemple dans le projet MitoCheck (<http://www.mitocheck.org/>) ou le projet visant à identifier les protéines impliquées dans la sécrétion ([http://www-db.embl.de/jss/-EmblGroupsHD/g\\_50.html](http://www-db.embl.de/jss/-EmblGroupsHD/g_50.html)). L'approche générale consiste à cultiver des cellules sur des plaques sur lesquelles sont déposées les séquences dsARN, à acquérir des images en fluorescence par microscopie à haut-débit, et à analyser, de manière automatique, les phénotypes observés. L'ensemble des opérations est réalisé à l'aide de robots pour la manipulation des plaques contenant les séquences ARN et les cellules. La technique est maintenant bien décrite et exploitable à large échelle (Erfle *et al.*, 2004; Pepperkok & Ellenberg, 2006; Neumann *et al.*, 2006; Erfle *et al.*, 2007). Un des intérêts de cette technique est la possibilité de réutiliser les plaques portant une cinquantaine de séquences d'ARN pendant un temps assez important, au moins sept mois (Neumann *et al.*, 2006). Les cellules sont ensuite déposées sur ces plaques, et vont ingérer les séquences ARN, ce qui induit l'effet d'interférence par l'ARN. L'observation est réalisée 24 à 48h plus tard, par acquisition avec un microscope à épifluorescence monté dans une chambre à 37°C pour conserver les cellules dans des conditions optimales. Il est possible de réaliser des timelapses, la fréquence d'acquisition, n'étant bien sûr pas très élevée dans cette configuration, de l'ordre d'une image par demi-heure, mais sur plus de 1000 points par expérience.

Ces études nécessitent une analyse automatisée des données générées. Pour donner un ordre d'idée, l'analyse par ARN interférent dans le cadre du projet mitochek génère 100 Go pour un time-lapse sur 400 ARN, ce qui nécessite une capacité de stockage et un réseau de transfert adapté. L'analyse repose bien évidemment sur un programme d'analyse automatique des images produites. Le programme que j'ai développé dans le cadre de mon travail de thèse est limité par la nécessité de réaliser certaines étapes manuellement (principalement la délimitation du contour de la cellule). Automatiser cette étape permettrait de rendre l'outil plus performant et potentiellement fonctionnel dans des études à grande échelle, couplé à de l'acquisition à haut-débit par microscopie. Dans le cadre d'une étude sur la polarité il faudrait envisager une approche utilisant une lignée exprimant l'histone H2B-GFP et une protéine localisée asymétriquement fusionnée à la dsRed

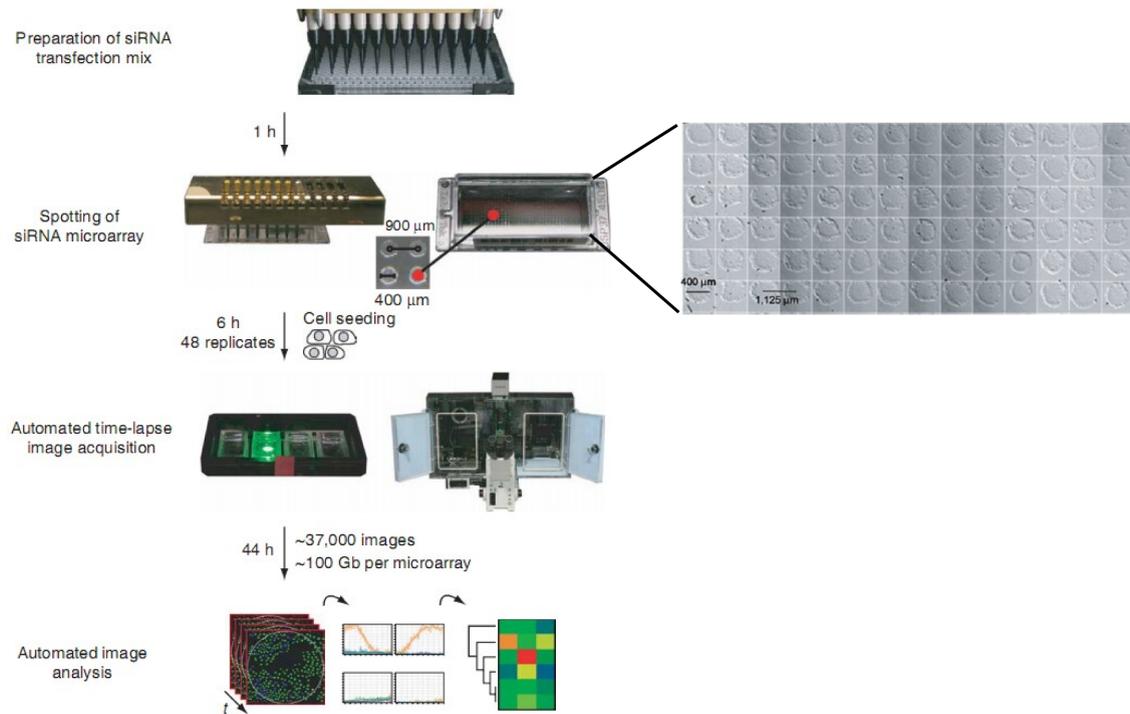


FIGURE A-9 – Principales étapes d’une analyse à grande échelle couplant de la microscopie à l’ARN interférent

Les séquences ARN sont déposées par un automate sur des plaques, dans des spots de 400  $\mu\text{m}$  de diamètre (à droite). Les cellules sont déposées sur ces plaques, et une acquisition time-lapse à raison d’une image toutes les 30 min est réalisée (au centre). Les données stockées sont alors analysées de façon automatique pour attribuer un phénotype basé sur l’évaluation de plusieurs paramètres (en bas). D’après (Neumann *et al.*, 2006; Pepperkok & Ellenberg, 2006; Erfle *et al.*, 2007)

ou autre, pour pouvoir suivre à la fois l’établissement de la polarité et l’orientation du fuseau. La combinaison de l’étude des réseaux transcriptionnels pour définir des listes de gènes potentiellement intéressants, à une étude phénotypique de ces gènes par l’utilisation de microscopie à haut-débit et analyse automatique du comportement du fuseau et de la polarité planaire de la cellule se positionne donc comme un outil très puissant dans la compréhension du phénomène de polarité planaire.

# Programmes Matlab

Cette partie contient le code des principaux programmes utilisés au cours de ce travail. Ces programmes ont été écrits sous Matlab, ce langage offrant de nombreux avantages. D'une part la syntaxe est courte et efficace, les opérations sur les variables s'écrivent en peu de lignes. D'autre part le langage de base comporte de nombreuses fonctions permettant d'effectuer toutes sortes d'opérations sur les matrices, évitant ainsi un travail de définition de fonction de base qui peut être fastidieux. Enfin Matlab possède des outils de visualisation 2D et 3D simple mais efficace, qui permettent de représenter des données complexes. Ce langage comme la plupart des langages permet l'écriture de scripts ou programmes pouvant importer des données, effectuer des calculs, représenter ces données et enregistrer les résultats. Un défaut de Matlab est la difficulté de créer un environnement accueillant pour des utilisateurs n'ayant pas de connaissance en programmation. Je souhaite dans l'avenir explorer les possibilités offertes par Python, logiciel général de programmation, qui dispose d'une communauté très active particulièrement dans le domaine scientifique, des versions de Python orienté pour une utilisation scientifique étant disponibles (Python(x,y)).

## Comportement du fuseau

Ce programme (page A-1) importe les données de la délimitation des contours de la cellule et de la masse chromosomique et va réaliser l'ensemble des calculs des différents paramètres. Les paramètres calculés sont la distance intercentroïde, la distance de la plaque métaphasique aux bords de la cellule, l'angle du fuseau par rapport à l'orientation en anaphase, la différence de la forme de la cellule par rapport à un cercle pour évaluer sa forme, la somme des angles effectués par le fuseau, et le ratio de l'axe court sur l'axe long de la masse chromosomique pour évaluer l'alignement.

## Calcul de la Co-organisation

Ce programme (page A-24) importe les données de la mesure d'intensité à la membrane des signaux CLIP-170 et NuMA pour calculer la co-organisation de ces deux protéines. Dans un premier temps les signaux sont redistribués sur une échelle de 0 à 100 % pour faciliter la comparaison. Dans un deuxième temps les clusters de chacun des signaux sont sélectionnés, sur la base de taille et d'intensité de signal. Un cluster CLIP-170 correspond à au moins trois pixels consécutifs dont l'intensité est au dessus de 40%, un cluster de NuMA correspond à la même taille mais l'intensité doit être au dessus de 20%. Deux clusters séparés d'un seul cluster sont fusionnés en un seul cluster. L'étape suivante est la mesure proprement dite de co-organisation, où l'on regarde la taille commune aux deux clusters par rapport à la taille totale du cluster.

## **Calcul des angles dans la crypte**

Ce programme nécessite plusieurs fonctions, expliquées dans l'ordre. Le script 'concatenate' (page A-37) permet de rassembler les données mesurées sur plusieurs expériences en un fichier exploitable pour le calcul des angles. Le script 'cryptcalculus' (page A-39) va réaliser le calcul des angles d'orientation avec l'axe long de la crypte et l'alignement planaire du fuseau avec le pôle apical. Le calcul se fait par l'utilisation du script 'transform' (page A-39). La représentation des angles est effectuée par le script 'plotanglecrypt' (page A-40).

## Programme Comportement Fuseau

```
function Totaltan()

global F

prompt={ 'Directory?',...
         'FileName for coordonnate ?',...
         'Draw cell ?',...
         'Nb of fields ?',...
         'Max Nb of Mitosis ?',...
         'Digit Nb for field ?',...
         'Ratio between X,Y & Z',...
         'Draw Barycentre ?',...
         'Draw circle ?',...
         'Draw Hoechst ?',...
         'Draw Hoexhst barycentre ?',...
         'Draw Ext Point ?'};

def = { 'I:\Julien\AnalysisCell\APC',...
        'Mitosis',...
        'Y',...
        '1',...
        '1',...
        '2',...
        '2',...
        'N',...
        'N',...
        'Y',...
        'Y',...
        'Y'};

dlgTitle='Analyse positionnement fuseau dans la cellule';
lineNo=1;
Answer=inputdlg(prompt,dlgTitle,lineNo,def,'on');

tic
Directory=Answer{1};
RootName=Answer{2};
DrawCell=Answer{3};
LastRank=Answer{4};
LastRank=str2num(LastRank);
NbrMaxMitose=Answer{5};
NbrMaxMitose=str2num(NbrMaxMitose);
DigitNb=Answer{6};
RatioZ=Answer{7};
RatioZ=str2num(RatioZ);
DrawBarycentre=Answer{8};
DrawCircle=Answer{9};
DrawHoechst=Answer{10};
DrawBarycentreDNA=Answer{11};
DrawExtPoint=Answer{12};
DigitFormat=['%0',DigitNb,'.f'];
eval(['cd ',Directory]);

FileNamePhase = ['APC-Phase.csv'];
[NAME,NEB,PLA,ANA,CYTO] = textread(FileNamePhase,'%16c%2d%2d%2d%2d','delimiter','\t');
NumbFileAnal = 0;

for RankLoop=[1:LastRank]
    for RankLoop1=[1:NbrMaxMitose]
        FileName=[RootName,'_',sprintf(DigitFormat,RankLoop),'-',sprintf(DigitFormat,RankLoop1),'_02
.log'];
        FileName1=[RootName,'_',sprintf(DigitFormat,RankLoop),'-',sprintf(DigitFormat,RankLoop1),'_0
1.log'];
        NameMitosis =
[RootName,'_',sprintf(DigitFormat,RankLoop),'-',sprintf(DigitFormat,RankLoop1),'_01'];
s=exist(FileName);
if s==2
    NumbFileAnal = NumbFileAnal + 1;
    if NAME(NumbFileAnal,:)~=NameMitosis
        error('Probleme de nom entre phase et analyse');
    end

    [F.Data{NumbFileAnal}.Coord.X1,F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Y1,F.Data{NumbFileAnal}.Coord.
Z1]=textread(FileName,'...

```

```

        , 'delimiter', ','); %! on met les données de la forme de la cellule dans 1 alors que
le fichier est 02.log

[data]= textread(FileName1, '%s', 'delimiter', ',');

%pour mettre coordonnées Hoechst dans matrice, vient du fait que donnée sous forme
"zplan" puis x,y,x1,y1..."zplan1"...
j=1;
k=1;
% dans un premier temps on va chercher les plans z
for i=1:length(data)
    if data{i}(1) == ''
        zplan(j) = str2num(data{i}(2:length(data{i}))-1);
        index(j) = i;
        j=j+1;
    end
end
for i=1:zplan(end)-1
    indexzplan = find(zplan(:) == i);
    indexzplan = index(indexzplan);
    indexnextzplan = find(zplan(:) == i+1);
    indexnextzplan = index(indexnextzplan);
    indexfill=[];
    for j=1:length(indexzplan)-1
        indexfill = [indexfill, indexzplan(j)+1:2:indexzplan(j+1)-1];
    end
    indexfill = [indexfill, indexzplan(end)+1:2:indexnextzplan(1)-1];
    for m=1:length(indexfill)
        F.Data{NumbFileAnal}.Coord.X2(k) = str2num(data{indexfill(m)});
        F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Y2(k) = str2num(data{indexfill(m)+1});
        F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z2(k) = i;
        k=k+1;
    end
end
% pour dernier plan z
indexfill = [];
for j=1:length(indexnextzplan)-1
    indexfill = [indexfill, indexnextzplan(j)+1:2:indexnextzplan(j+1)-1];
end
indexfill = [indexfill, indexnextzplan(end)+1:2:length(data)];
for i=1:length(indexfill)
    F.Data{NumbFileAnal}.Coord.X2(k) = str2num(data{indexfill(i)});
    F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Y2(k) = str2num(data{indexfill(i)+1});
    F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z2(k) = zplan(end);
    k=k+1;
end
clear zplan;

if (F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z1(end)-F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z1(1)) < 0
    F.Data{NumbFileAnal}.Coord.X1=flipdim(F.Data{NumbFileAnal}.Coord.X1,1);
    F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Y1=flipdim(F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Y1,1);
    F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z1=flipdim(F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z1,1);
end
% va mettre en colonne si données sont en ligne
sizetemp=size(F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z1);
if sizetemp(1)<sizetemp(2)
    F.Data{NumbFileAnal}.Coord.X1=F.Data{NumbFileAnal}.Coord.X1';
    F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Y1=F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Y1';
    F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z1=F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z1';
end

sizetemp=size(F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z2);
if sizetemp(1)<sizetemp(2)
    F.Data{NumbFileAnal}.Coord.X2=F.Data{NumbFileAnal}.Coord.X2';
    F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Y2=F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Y2';
    F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z2=F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z2';
end

% dans certains fichiers le premier plan Z est à 0, alors que dans la plupart il est à 1
if F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z1(1) == 0
    F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z1 = F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z1 + 1;
end

if F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z2(1) == 0
    F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z2 = F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z2 + 1;
end

```

```

end

NbTotalPlaneCell=F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z1(end)-F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z1(1);

p=1;
m=1;
for i=1:NbTotalPlaneCell % peut etre simplifier en prenant directement dernier plan,
car il y aura peu d'erreur
    if F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z1(p)~=F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z1(end) % et
donc le nbr de plans correspond au dernier plan
        AllPlane=find(F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z1(:)>F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z1(p))
;
        if ~isempty(AllPlane)
            m=m+1;
            p=AllPlane(1);
            AllPlane=0;
        end
    end
end

NbPlaneCell=m;
F.Data{NumbFileAnal}.NbPlaneCell = m;
p=1;

NbTotalPlaneCell1=F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z2(end)-F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z2(1);

p=1;
m=1;
AllPlane=0;
for i=1:NbTotalPlaneCell1 % meme commentaire que précédement
    if F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z2(p)~=F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z2(end)
        AllPlane=find(F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z2(:)>F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z2(p))
;
        if ~isempty(AllPlane)
            m=m+1;
            p=AllPlane(1);
            AllPlane=0;
        end
    end
end

NbPlaneCell1=m;
F.Data{NumbFileAnal}.NbPlaneCell1 = m;
p=1;

if NbPlaneCell1 ~= NbPlaneCell
    error(dlg(['pas le meme nombre de plans entre forme Hoechst et
Cellule', '\',FileName, '\',num2str(NbPlaneCell), '\',num2str(NbPlaneCell1)]));
end

% temps des phases de la mitose
F.Name{NumbFileAnal} = NameMitosis;
F.Data{NumbFileAnal}.NEB = NEB(NumbFileAnal);
F.Data{NumbFileAnal}.PLA = PLA(NumbFileAnal);
F.Data{NumbFileAnal}.ANA = ANA(NumbFileAnal);
F.Data{NumbFileAnal}.CYTO = CYTO(NumbFileAnal);

if F.Data{NumbFileAnal}.NEB == -1
    F.Data{NumbFileAnal}.NEB = 1;
end

if F.Data{NumbFileAnal}.PLA == -1
    F.Data{NumbFileAnal}.PLA = 1;
end

if F.Data{NumbFileAnal}.ANA>NbPlaneCell
    F.Data{NumbFileAnal}.ANA=NbPlaneCell ;
end

if F.Data{NumbFileAnal}.CYTO>NbPlaneCell
    F.Data{NumbFileAnal}.CYTO=NbPlaneCell ;
end

% repartition des données dans une matrice contenant X,Y par plan Z
% CoordPerPlane : coordonnées pour la forme de la cellule

```

```

for i=1:NbPlaneCell
    IndexNext=find(F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z1(:)==i);
    if ~isempty(IndexNext)
        Index = length(IndexNext);
        F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(1:Index,1,i) =
F.Data{NumbFileAnal}.Coord.X1(IndexNext);
        F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(1:Index,2,i) =
F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Y1(IndexNext);
    end
end

% CoordPerPlaneDNA : coordonnées pour la masse chromosomique
for i=1: NbPlaneCell1
    IndexNext=find(F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z2(:)==i);
    if ~isempty(IndexNext)
        Index = length(IndexNext);
        F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(1:Index,1,i) =
F.Data{NumbFileAnal}.Coord.X2(IndexNext);
        F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(1:Index,2,i) =
F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Y2(IndexNext);
    end
end

% calcul du centroide de la cellule
for i=1:NbPlaneCell
    IndexCoord = find(F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(:,1,i)~=0);
    LengthPlane=length(IndexCoord);
    F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Bary(i,1) =
sum(F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(IndexCoord,1,i))/LengthPlane;
    F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Bary(i,2) =
sum(F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(IndexCoord,2,i))/LengthPlane;
end

% calcul du centroide de la masse chromosomique
for i=1: NbPlaneCell1
    IndexCoord = find(F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(:,1,i)~=0);
    LengthPlane=length(IndexCoord);
    F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,1) =
sum(F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(IndexCoord,1,i))/LengthPlane;
    F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,2) =
sum(F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(IndexCoord,2,i))/LengthPlane;
end

% Calcul du diametre moyen du cercle symbolisant l'exterieur de la cellule
for i = 1:NbPlaneCell
    LengthPlane = length(find(F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(:,1,i)~=0));

    F.Data{NumbFileAnal}.DistMoy(1:LengthPlane,i) =
sqrt((F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Bary(i,1) - ...
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(1:LengthPlane,1,i)).^2 +
(F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Bary(i,2) - ...
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(1:LengthPlane,2,i)).^2);

    IndexNotNull = find(F.Data{NumbFileAnal}.DistMoy(:,i)~=0);
    FindSizeNotNull = length(IndexNotNull);
    if ~isempty(FindSizeNotNull)
        F.Data{NumbFileAnal}.DistMoyDia(i) =
sum(F.Data{NumbFileAnal}.DistMoy(IndexNotNull,i)) / FindSizeNotNull;
    end
end

% Cacul de la distance des points du contour de la masse chromosomique au centroide de
la masse,
% index sur la plus courte : F.Data{NumbFileAnal}.IndexMin1(i)
% la plus longue distance : F.Data{NumbFileAnal}.IndexMax1(i)
% IndexZero = IX(1:100); ces deux lignes servent à mettre à

```

```

0 les valeurs proches du min
% ou max trouvés afin de selectionner le min ou max opposé et non adjacent au premier
trouvé

for i = 1:NbPlaneCell1
    LengthPlane = length(find(F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(:,1,i)~=0));

    F.Data{NumbFileAnal}.DistDNAMin(1:LengthPlane,i) =
sqrt((F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,1)...
- F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(1:LengthPlane,1,i)).^2 +
(F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,2)...
- F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(1:LengthPlane...
,2,i)).^2);

    Index = find(F.Data{NumbFileAnal}.DistDNAMin(:,i)>0);
    Min = find(F.Data{NumbFileAnal}.DistDNAMin(:,i) ==
min(F.Data{NumbFileAnal}.DistDNAMin(Index,i)));
    F.Data{NumbFileAnal}.IndexMin1(i) = Min(1);

    DistFromMin(1:LengthPlane) = sqrt((F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(Min(1),1,i)
...
- F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(1:LengthPlane,1,i)).^2 + ...
((F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(Min(1),2,i) - ...
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(1:LengthPlane,2,i)).^2));

    [SortDistMin,IX]=sort(DistFromMin(:));
    IndexZero = IX(1:round(length(Index(:))/10)); %IndexZero = IX(1:100)
    F.Data{NumbFileAnal}.DistDNAMin(IndexZero,i) = 0;
    Index = find(F.Data{NumbFileAnal}.DistDNAMin(:,i)>0);
    Min = find(F.Data{NumbFileAnal}.DistDNAMin(:,i) ==
min(F.Data{NumbFileAnal}.DistDNAMin(Index,i)));
    F.Data{NumbFileAnal}.IndexMin2(i) = Min(1);
end

for i = 1 : NbPlaneCell1
    LengthPlane=length(find(F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(:,1,i)~=0));

    F.Data{NumbFileAnal}.DistDNAMax(1:LengthPlane,i) =
sqrt((F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,1)...
- F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(1:LengthPlane,1,i)).^2 + ...
(F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,2) -
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(1:LengthPlane,2,i)).^2);
    F.Data{NumbFileAnal}.distmax(1:LengthPlane,i) =
F.Data{NumbFileAnal}.DistDNAMax(1:LengthPlane,i); % temp

    Max = find(F.Data{NumbFileAnal}.DistDNAMax(:,i) ==
max(F.Data{NumbFileAnal}.DistDNAMax(:,i)));
    F.Data{NumbFileAnal}.IndexMax1(i) = Max(1);

    DistFromMax(1:LengthPlane) = sqrt((F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(Max(1),1,i)
...
- F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(1:LengthPlane,1,i)).^2 + ...
(F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(Max(1),2,i) - ...
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(1:LengthPlane,2,i)).^2);

    [SortDistMax,IX]=sort(DistFromMax(:));
    IndexZero = IX(1:100);
    F.Data{NumbFileAnal}.DistDNAMax(IndexZero,i) = 0;
    Max = find(F.Data{NumbFileAnal}.DistDNAMax(:,i) ==
max(F.Data{NumbFileAnal}.DistDNAMax(:,i)));
    F.Data{NumbFileAnal}.IndexMax2(i) = Max(1);
end

% Calcul de la distance entre centroide cellule et centroide Hoechst
for i = 1: NbPlaneCell1
    F.Data{NumbFileAnal}.DistCellDNA(i) = sqrt ((F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,1)
- ...
F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Bary(i,1))^2 +
(F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,2) - ...
F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Bary(i,2))^2);
end

% Calcul des droites représentant l'axe long et court de la masse chromosomique
% On utilise une matrice de covariance pour trouver le moment d'inertie du nuage de
point

```

```
% Le premier vecteur (passant par le barycentre) représente l'axe long, le vecteur
perpendiculaire l'axe court
```

```
% Calcul de l'axe long de la masse chromosomique
```

```
for i=1 : NbPlaneCell1
clear C R S T delta
Indexvalue = find(F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(:,1,i)~= 0);
C(:,1) = F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(Indexvalue,1,i);
C(:,2) = F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(Indexvalue,2,i);
n = length(C);
R = ((n - 1) / n) * cov(C);
delta = max(eig(R));
S = [(R(4) - delta);-R(2)];
T = [0 -1;1 0] * S;

F.Data{NumbFileAnal}.S1(i) = S(1);
F.Data{NumbFileAnal}.S2(i) = S(2);
F.Data{NumbFileAnal}.T1(i) = T(1);
F.Data{NumbFileAnal}.T2(i) = T(2);

if S(1)>0
Coordxa = max(F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(Indexvalue,1,i));
Coefx1 = (Coordxa - F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,1))/ S(1);
Coordya = F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,2) + Coefx1 * S(2);
else
Coordxa = min(F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(Indexvalue,1,i));
Coefx1 = (Coordxa - F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,1))/ S(1);
Coordya = F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,2) + abs(Coefx1) * S(2);
end
Coordxb = 2 * F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,1) - Coordxa;
Coordyb = 2 * F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,2) - Coordya;

F.Data{NumbFileAnal}.TraceA(i,1) = Coordxa;
F.Data{NumbFileAnal}.TraceA(i,2) = Coordya;
F.Data{NumbFileAnal}.TraceB(i,1) = Coordxb;
F.Data{NumbFileAnal}.TraceB(i,2) = Coordyb;
F.Data{NumbFileAnal}.CoefGlobalC(i) = (Coordya - Coordyb) / (Coordxa - Coordxb);
F.Data{NumbFileAnal}.CoefGlobalD(i) = Coordyb - F.Data{NumbFileAnal}.CoefGlobalC(i)
```

```
* Coordxa;
```

```
% Calcul de l'axe court
```

```
if T(1)>0
Coordxa = max(F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(Indexvalue,1,i));
Coefx1 = (Coordxa - F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,1))/ T(1);
Coordya = F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,2) + Coefx1 * T(2);
else
Coordxa = min(F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(Indexvalue,1,i));
Coefx1 = (Coordxa - F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,1))/ T(1);
Coordya = F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,2) + abs(Coefx1) * T(2);
end
Coordxb = 2 * F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,1) - Coordxa;
Coordyb = 2 * F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,2) - Coordya;

F.Data{NumbFileAnal}.TraceAShort(i,1) = Coordxa;
F.Data{NumbFileAnal}.TraceAShort(i,2) = Coordya;
F.Data{NumbFileAnal}.TraceBShort(i,1) = Coordxb;
F.Data{NumbFileAnal}.TraceBShort(i,2) = Coordyb;
F.Data{NumbFileAnal}.CoefGlobalC(i) = (Coordya - Coordyb) / (Coordxa - Coordxb);
F.Data{NumbFileAnal}.CoefGlobalD(i) = Coordyb - F.Data{NumbFileAnal}.CoefGlobalC(i)
```

```
* Coordxa;
```

```
end
```

```
% calcul de la distance des points de la masse chromosomique a la droite de l'axe court
```

```
for i=1: NbPlaneCell1
Index = length(find(F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(:,1,i)~=0));
xA = zeros(Index,1) + F.Data{NumbFileAnal}.TraceAShort(i,1);
yA = zeros(Index,1) + F.Data{NumbFileAnal}.TraceAShort(i,2);
xB = zeros(Index,1) + F.Data{NumbFileAnal}.TraceBShort(i,1);
yB = zeros(Index,1) + F.Data{NumbFileAnal}.TraceBShort(i,2);
xC = F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(1:Index,1,i);
```

```

yC = F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(1:Index,2,i);
clear distancecentroidtoext;
clear distancepointtoline;
distancecentroidtoext(1:Index) = sqrt((xB - xA).^2 + (yB - yA).^2);
distancepointtoline(1:Index) = abs(((xB - xA) .* (yA - yC)) - ((xA - xC) .* (yB -
yA))) ./ ...
    (distancecentroidtoext(1:Index)');

IndexNot0 = find(distancepointtoline(:) ~= 0);
Point = find(distancepointtoline(:) == min(distancepointtoline(:)));
if ~isempty(Point)
    F.Data{NumbFileAnal}.MinDist(i,1) = Point(1);
    DistFromMin(1:Index) = sqrt((F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(1:Index,1,i)
...
        - F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(Point(1),1,i)).^2 + ...
        (F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(1:Index,2,i) ...
        - F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(Point(1),2,i)).^2);
[SortDistMin,IX]=sort(DistFromMin(:));
IndexZero = IX(1:10);
distancepointtoline(IndexZero) = 0;
IndexNot0 = find(distancepointtoline(:) ~= 0);
clear Point;
Point = find(distancepointtoline(:) == min(distancepointtoline(IndexNot0)));
clear distancepointtoline;
if ~isempty(Point)
    F.Data{NumbFileAnal}.MinDist(i,2) = Point(1);
    clear Point;
end
end
clear Point;
end

% calcul de la distance des points de la masse chromosomique a la droite de l'axe long
for i=1:NbPlaneCell1
    Index = length(find(F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(:,1,i)~=0));
    xA = zeros(Index,1) + F.Data{NumbFileAnal}.TraceA(i,1);
    yA = zeros(Index,1) + F.Data{NumbFileAnal}.TraceA(i,2);
    xB = zeros(Index,1) + F.Data{NumbFileAnal}.TraceB(i,1);
    yB = zeros(Index,1) + F.Data{NumbFileAnal}.TraceB(i,2);
    xC = F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(1:Index,1,i);
    yC = F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(1:Index,2,i);
    clear distancecentroidtoext;
    clear distancepointtoline;
    distancecentroidtoext(1:Index) = sqrt((xB - xA).^2 + (yB - yA).^2);
    distancepointtoline(1:Index) = abs(((xB - xA) .* (yA - yC)) - ((xA - xC) .* (yB -
yA))) ./ ...
        (distancecentroidtoext(1:Index)');
    IndexNot0 = find(distancepointtoline(:) ~= 0);
    Point = find(distancepointtoline(:) == min(distancepointtoline(:)));
    if ~isempty(Point)
        F.Data{NumbFileAnal}.MinDist(i,3) = Point(1);
        DistFromMin(1:Index) = sqrt((F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(1:Index,1,i)
...
            - F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(Point(1),1,i)).^2 + ...
            (F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(1:Index,2,i) ...
            - F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(Point(1),2,i)).^2);
        [SortDistMin,IX]=sort(DistFromMin(:));
        IndexZero = IX(1:10);
        distancepointtoline(IndexZero) = 0;
        IndexNot0 = find(distancepointtoline(:) ~= 0);
        clear Point;
        Point = find(distancepointtoline(:) == min(distancepointtoline(IndexNot0)));
        clear distancepointtoline;
        if ~isempty(Point)
            F.Data{NumbFileAnal}.MinDist(i,4) = Point(1);
            clear Point;
        end
    end
    clear Point;
end

%%%%%%%%%

% calcul de la distance des points de la cellule a la droite de l'axe court

```

```

for i=1: NbPlaneCell1

    Index = length(find(F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(:,1,i)~=0));
    xA = zeros(Index,1) + F.Data{NumbFileAnal}.TraceAShort(i,1);
    yA = zeros(Index,1) + F.Data{NumbFileAnal}.TraceAShort(i,2);
    xB = zeros(Index,1) + F.Data{NumbFileAnal}.TraceBShort(i,1);
    yB = zeros(Index,1) + F.Data{NumbFileAnal}.TraceBShort(i,2);
    xC = F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(1:Index,1,i);
    yC = F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(1:Index,2,i);
    clear distancecentroidtoext;
    clear distancepointtoline;
    distancecentroidtoext(1:Index) = sqrt((xB - xA).^2 + (yB - yA).^2);
    distancepointtoline(1:Index) = abs(((xB - xA) .* (yA - yC)) - ((xA - xC) .* (yB -
yA))) ./ ...
        (distancecentroidtoext(1:Index)');

    IndexNot0 = find(distancepointtoline(:) ~= 0);
    Point = find(distancepointtoline(:) == min(distancepointtoline(:)));
    if ~isempty(Point)
        F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i,1) = Point(1);
        DistFromMin(1:Index) = sqrt((F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(1:Index,1,i) ...
            - F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(Point(1),1,i)).^2 ...
            + (F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(1:Index,2,i) ...
            - F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(Point(1),2,i)).^2);
        [SortDistMin,IX]=sort(DistFromMin(:));
        IndexZero = IX(1:10);
        distancepointtoline(IndexZero) = 0;
        IndexNot0 = find(distancepointtoline(:) ~= 0);
        clear Point;
        Point = find(distancepointtoline(:) == min(distancepointtoline(IndexNot0)));
        clear distancepointtoline;
        if ~isempty(Point)
            F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i,2) = Point(1);
            clear Point;
        end
    end
    clear Point;
    clear DistFromMin;
end

% calcul de la distance des points de la cellule a la droite de l'axe long

for i=1: NbPlaneCell1

    Index = length(find(F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(:,1,i)~=0));
    xA = zeros(Index,1) + F.Data{NumbFileAnal}.TraceA(i,1);
    yA = zeros(Index,1) + F.Data{NumbFileAnal}.TraceA(i,2);
    xB = zeros(Index,1) + F.Data{NumbFileAnal}.TraceB(i,1);
    yB = zeros(Index,1) + F.Data{NumbFileAnal}.TraceB(i,2);
    xC = F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(1:Index,1,i);
    yC = F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(1:Index,2,i);
    clear distancecentroidtoext;
    clear distancepointtoline;
    distancecentroidtoext(1:Index) = sqrt((xB - xA).^2 + (yB - yA).^2);
    distancepointtoline(1:Index) = abs(((xB - xA) .* (yA - yC)) - ((xA - xC) .* (yB -
yA))) ./ ...
        (distancecentroidtoext(1:Index)');

    IndexNot0 = find(distancepointtoline(:) ~= 0);
    Point = find(distancepointtoline(:) == min(distancepointtoline(:)));
    if ~isempty(Point)
        F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i,3) = Point(1);
        DistFromMin(1:Index) = sqrt((F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(1:Index,1,i) ...
            - F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(Point(1),1,i)).^2 ...
            + (F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(1:Index,2,i) ...
            - F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(Point(1),2,i)).^2);
        [SortDistMin,IX]=sort(DistFromMin(:));
        IndexZero = IX(1:10);
        distancepointtoline(IndexZero) = 0;
        IndexNot0 = find(distancepointtoline(:) ~= 0);
        clear Point;
        Point = find(distancepointtoline(:) == min(distancepointtoline(IndexNot0)));
        clear distancepointtoline;
        if ~isempty(Point)
            F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i,4) = Point(1);

```

```

        clear Point;
    end
end
clear Point;
clear DistFromMin;
end

% Calcul de la différence absolue entre axe court de la masse chromosomique aux bords de
la cellule
% ! si la distance du centroïde de la masse chromosomique à la cellule est inférieure à
la distance au bord de la
% masse chromosomique la distance entre bord masse chromosomique et cellule est mis à 0

for i=1:NbPlaneCell
    Pointdnaxa =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{NumbFileAnal}.MinDist(i,1),1,i);
    Pointdnaya =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{NumbFileAnal}.MinDist(i,1),2,i);
    Pointdnaxb =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{NumbFileAnal}.MinDist(i,2),1,i);
    Pointdnayb =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{NumbFileAnal}.MinDist(i,2),2,i);
    DistA = sqrt((Pointdnaxa - F.Data{NumbFileAnal}.TraceAShort(i,1))^2 + ...
        (Pointdnaya - F.Data{NumbFileAnal}.TraceAShort(i,2))^2);
    DistB = sqrt((Pointdnaxa - F.Data{NumbFileAnal}.TraceBShort(i,1))^2 + ...
        (Pointdnaya - F.Data{NumbFileAnal}.TraceBShort(i,2))^2);
    if DistA<DistB
        Pointlinexa = F.Data{NumbFileAnal}.TraceAShort(i,1);
        Pointlineya = F.Data{NumbFileAnal}.TraceAShort(i,2);
        Pointlinexb = F.Data{NumbFileAnal}.TraceBShort(i,1);
        Pointlineyb = F.Data{NumbFileAnal}.TraceBShort(i,2);
    else
        Pointlinexa = F.Data{NumbFileAnal}.TraceBShort(i,1);
        Pointlineya = F.Data{NumbFileAnal}.TraceBShort(i,2);
        Pointlinexb = F.Data{NumbFileAnal}.TraceAShort(i,1);
        Pointlineyb = F.Data{NumbFileAnal}.TraceAShort(i,2);
    end
    DistC =
sqrt((F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i,1),1,i) - Pointlinexa)^2
+ ...
        (F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i,1),2,i) -
Pointlineya)^2);
    DistD =
sqrt((F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i,2),1,i) - Pointlinexa)^2
+ ...
        (F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i,2),2,i)-
Pointlineya)^2);
    if DistC<DistD
        Pointcellxa =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i,1),1,i);
        Pointcellya =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i,1),2,i);
        Pointcellxb =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i,2),1,i);
        Pointcellyb =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i,2),2,i);
    else
        Pointcellxa =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i,2),1,i);
        Pointcellya =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i,2),2,i);
        Pointcellxb =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i,1),1,i);
        Pointcellyb =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i,1),2,i);
    end
    Distbarydnaa = sqrt((Pointdnaxa - F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,1))^2 + ...
        (Pointdnaya - F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,2))^2);
    Distbarycella = sqrt((Pointcellxa - F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,1))^2 + ...
        (Pointcellya - F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,2))^2);
    Distbarydnab = sqrt((Pointdnaxb - F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,1))^2 + ...
        (Pointdnayb - F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,2))^2);
    Distbarycellb = sqrt((Pointcellxb - F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,1))^2 + ...
        (Pointcellyb - F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,2))^2);
    if Distbarydnaa > Distbarycella

```

```

        DistA = 0;
    else
        DistA = sqrt((Pointcellxa - Pointdnaxa)^2 + (Pointcellya - Pointdnaya)^2);
    end
    if Distbarydnab > Distbarycellb
        DistB = 0;
    else
        DistB = sqrt((Pointcellxb - Pointdnaxb)^2 + (Pointcellyb - Pointdnayb)^2);
    end
    F.Data{NumbFileAnal}.DistRatio(i) = abs(DistA-DistB);
end

% Calcul de la différence absolue entre axe long de la masse chromosomique aux bords de
la cellule

for i=1:NbPlaneCell
    Pointdnaxa =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{NumbFileAnal}.MinDist(i,3),1,i);
    Pointdnaya =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{NumbFileAnal}.MinDist(i,3),2,i);
    Pointdnaxb =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{NumbFileAnal}.MinDist(i,4),1,i);
    Pointdnayb =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{NumbFileAnal}.MinDist(i,4),2,i);
    DistA = sqrt((Pointdnaxa - F.Data{NumbFileAnal}.TraceA(i,1))^2 + ...
        (Pointdnaya - F.Data{NumbFileAnal}.TraceA(i,2))^2);
    DistB = sqrt((Pointdnaxa - F.Data{NumbFileAnal}.TraceB(i,1))^2 + ...
        (Pointdnaya - F.Data{NumbFileAnal}.TraceB(i,2))^2);
    if DistA<DistB
        Pointlinexa = F.Data{NumbFileAnal}.TraceA(i,1);
        Pointlineya = F.Data{NumbFileAnal}.TraceA(i,2);
        Pointlinexb = F.Data{NumbFileAnal}.TraceB(i,1);
        Pointlineyb = F.Data{NumbFileAnal}.TraceB(i,2);
    else
        Pointlinexa = F.Data{NumbFileAnal}.TraceB(i,1);
        Pointlineya = F.Data{NumbFileAnal}.TraceB(i,2);
        Pointlinexb = F.Data{NumbFileAnal}.TraceA(i,1);
        Pointlineyb = F.Data{NumbFileAnal}.TraceA(i,2);
    end
    DistC =
sqrt((F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i,3),1,i) - Pointlinexa)^2 +
    ...
        (F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i,3),2,i) -
Pointlineya)^2);
    DistD =
sqrt((F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i,4),1,i) - Pointlinexa)^2 +
    ...
        (F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i,4),2,i) -
Pointlineya)^2);
    if DistC<DistD
        Pointcellxa =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i,3),1,i);
        Pointcellya =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i,3),2,i);
        Pointcellxb =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i,4),1,i);
        Pointcellyb =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i,4),2,i);
    else
        Pointcellxa =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i,4),1,i);
        Pointcellya =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i,4),2,i);
        Pointcellxb =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i,3),1,i);
        Pointcellyb =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i,3),2,i);
    end
    Distbarydnaa = sqrt((Pointdnaxa - F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,1))^2 + ...
        (Pointdnaya - F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,2))^2);
    Distbarycella = sqrt((Pointcellxa - F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,1))^2 + ...
        (Pointcellya - F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,2))^2);
    Distbarydnab = sqrt((Pointdnaxb - F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,1))^2 + ...
        (Pointdnayb - F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,2))^2);
    Distbarycellb = sqrt((Pointcellxb - F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,1))^2 + ...

```

```

        (Pointcellyb - F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,2))^2);
if Distbarydnaa > Distbarycella
    DistA = 0;
else
    DistA = sqrt((Pointcellxa - Pointdnaxa)^2 + (Pointcellya - Pointdnaya)^2);
end
if Distbarydnab > Distbarycellb
    DistB = 0;
else
    DistB = sqrt((Pointcellxb - Pointdnaxb)^2 + (Pointcellyb - Pointdnayb)^2);
end

F.Data{NumbFileAnal}.DistRatio1(i) = abs(DistA-DistB);
end

% Calcul de la distance entre rayon moyen et bord de la cellule et moyennage

for i=1:NbPlaneCell
    Index = length(find(F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(:,1,i)~=0));

    DistTemp(1:Index) = sqrt((F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(1:Index,1,i) -
F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Bary(i,1)).^2 + ...
(F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(1:Index,2,i) -
F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Bary(i,2)).^2);
    Dist(1:Index) = abs(DistTemp(:) - F.Data{NumbFileAnal}.DistMoyDia(i));
    IndexNO = find(Dist(:) ~= 0);

    F.Data{NumbFileAnal}.SumDia(i) = sum(Dist(IndexNO)) / (length(IndexNO(:)));
    clear DistTemp Dist
end

% Calcul du ratio entre axe court et axe long de la masse chromosomique

for i=1:NbPlaneCell

    if F.Data{NumbFileAnal}.MinDist(i,1) ~= -1 & F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i,2)
    ~= -1
        DistA =
sqrt((F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{NumbFileAnal}.MinDist(i,1),1,i) -
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{NumbFileAnal}.MinDist(i,2),1,i))^2 + ...
(F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{NumbFileAnal}.MinDist(i,1),2,i)
) - F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{NumbFileAnal}.MinDist(i,2),2,i))^2);
        DistB =
sqrt((F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{NumbFileAnal}.MinDist(i,3),1,i) -
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{NumbFileAnal}.MinDist(i,4),1,i))^2 + ...
(F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{NumbFileAnal}.MinDist(i,3),2,i)
) - F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{NumbFileAnal}.MinDist(i,4),2,i))^2);

        F.Data{NumbFileAnal}.DistRatioDNA(i) = DistA/DistB;
    end
end

% Calcul de l'angle entre le fuseau du moment de la formation de la plaque métaphasique
jusqu'a l'anaphase

F.Data{NumbFileAnal}.Spindleangle = acos(abs(F.Data{NumbFileAnal}.TraceA(:,1) -
F.Data{NumbFileAnal}.TraceB(:,1)) ./ ...
sqrt((F.Data{NumbFileAnal}.TraceA(:,1) - F.Data{NumbFileAnal}.TraceB(:,1)).^2 + ...
(F.Data{NumbFileAnal}.TraceA(:,2) - F.Data{NumbFileAnal}.TraceB(:,2)).^2));
for i=1:length(F.Data{NumbFileAnal}.Spindleangle)
    if ~isreal(F.Data{NumbFileAnal}.Spindleangle(i))
        F.Data{NumbFileAnal}.Spindleangle(i)=pi;
    end
end
F.Data{NumbFileAnal}.Spindleangle = (F.Data{NumbFileAnal}.Spindleangle * 180)/pi;
if F.Data{NumbFileAnal}.Spindleangle(F.Data{NumbFileAnal}.ANA) > 0
    F.Data{NumbFileAnal}.Spindleanglecorr = F.Data{NumbFileAnal}.Spindleangle -
F.Data{NumbFileAnal}.Spindleangle(F.Data{NumbFileAnal}.ANA);
else
    F.Data{NumbFileAnal}.Spindleanglecorr = F.Data{NumbFileAnal}.Spindleangle +
F.Data{NumbFileAnal}.Spindleangle(F.Data{NumbFileAnal}.ANA);
end

% Calcul de l'angle du fuseau par rapport à l'axe en anaphase (en fait 1er point avant
anaphase)

```

```

% on prend comme référence pour l'axe final le point -1 avant l'anaphase

F.Data{NumbFileAnal}.EndAngle =
atan(abs(F.Data{NumbFileAnal}.TraceB(F.Data{NumbFileAnal}.ANA-1,2) - ...
      F.Data{NumbFileAnal}.TraceA(F.Data{NumbFileAnal}.ANA-1,2) /
(F.Data{NumbFileAnal}.TraceB(F.Data{NumbFileAnal}.ANA-1,1)...
      - F.Data{NumbFileAnal}.TraceA(F.Data{NumbFileAnal}.ANA-1,1)))));
EndAngle = F.Data{NumbFileAnal}.EndAngle;

if
F.Data{NumbFileAnal}.TraceB(F.Data{NumbFileAnal}.ANA-1,1)<F.Data{NumbFileAnal}.TraceA(F.Data{NumbFileAnal}.ANA-1,1) & ...
      F.Data{NumbFileAnal}.TraceB(F.Data{NumbFileAnal}.ANA-1,2)>F.Data{NumbFileAnal}.TraceA(F.Data{NumbFileAnal}.ANA-1,1)
      EndAngle=pi-EndAngle;
end
if
F.Data{NumbFileAnal}.TraceB(F.Data{NumbFileAnal}.ANA-1,1)<F.Data{NumbFileAnal}.TraceA(F.Data{NumbFileAnal}.ANA-1,1) & ...
      F.Data{NumbFileAnal}.TraceB(F.Data{NumbFileAnal}.ANA-1,2)<F.Data{NumbFileAnal}.TraceA(F.Data{NumbFileAnal}.ANA-1,1)
      EndAngle=pi+EndAngle;
end
if
F.Data{NumbFileAnal}.TraceB(F.Data{NumbFileAnal}.ANA-1,1)>F.Data{NumbFileAnal}.TraceA(F.Data{NumbFileAnal}.ANA-1,1) & ...
      F.Data{NumbFileAnal}.TraceB(F.Data{NumbFileAnal}.ANA-1,2)<F.Data{NumbFileAnal}.TraceA(F.Data{NumbFileAnal}.ANA-1,1)
      EndAngle=-EndAngle;
end

% matrix for changing raw data (EndAngle = 0)
ChangeMat=[cos(-EndAngle), -sin(-EndAngle); sin(-EndAngle), cos(-EndAngle)];

%Coordinate change
Coord1=ChangeMat*[F.Data{NumbFileAnal}.TraceA(:,1)'; F.Data{NumbFileAnal}.TraceA(:,2)'];
Coord2=ChangeMat*[F.Data{NumbFileAnal}.TraceB(:,1)'; F.Data{NumbFileAnal}.TraceB(:,2)'];
X1=Coord1(1,:);
Y1=Coord1(2,:);
X2=Coord2(1,:);
Y2=Coord2(2,:);

%Angle of spindle
Degree=180/pi;
F.Data{NumbFileAnal}.Alpha = atan(abs((Y2 - Y1)/(X2 - X1)))*Degree;
F.Data{NumbFileAnal}.Alpha = F.Data{NumbFileAnal}.Alpha -
F.Data{NumbFileAnal}.Alpha(F.Data{NumbFileAnal}.ANA);

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% calcul de l'angle entre chaque position, puis représentation par rapport à
% l'anaphase, on utilise l'axe court calculé de la masse chromosomique
% utilisation de la fonction atan2

pointsel(1,1) =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(1,1),1,1);
pointsel(1,2) =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(1,1),2,1);
pointsel(1,3) =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(1,2),1,1);
pointsel(1,4) =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(1,2),2,1);

for i=1:F.Data{NumbFileAnal}.NbPlaneCell-1
va =[pointsel(i,1) - pointsel(i,3), pointsel(i,2) - pointsel(i,4)];

vb =
[F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i+1,1),1,i+1) - ...
      F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i+1,2),1,i+1), ...
      F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i+1,1),2,i+1) - ...
      F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i+1,2),2,i+1)];
vbm = -vb;

```

```

anglea = atan2(vb(2),vb(1)) - atan2(va(2),va(1));
angleb = atan2(vbm(2),vbm(1)) - atan2(va(2),va(1));

if abs(anglea)<pi/2 | abs(angleb)<pi/2
    if abs(anglea)<abs(angleb)
        F.Data{NumbFileAnal}.angleatantemp(i) = anglea*180/pi;
        pointsel(i+1,1) =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i+1,1),1,i+1);
        pointsel(i+1,2) =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i+1,1),2,i+1);
        pointsel(i+1,3) =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i+1,2),1,i+1);
        pointsel(i+1,4) =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i+1,2),2,i+1);
    else
        F.Data{NumbFileAnal}.angleatantemp(i) = angleb*180/pi;
        pointsel(i+1,1) =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i+1,2),1,i+1);
        pointsel(i+1,2) =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i+1,2),2,i+1);
        pointsel(i+1,3) =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i+1,1),1,i+1);
        pointsel(i+1,4) =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i+1,1),2,i+1);
    end
else
    if abs(anglea)<abs(angleb)
        if angleb>0
            F.Data{NumbFileAnal}.angleatantemp(i) = (angleb - 2*pi)*180/pi;
        else
            F.Data{NumbFileAnal}.angleatantemp(i) = (angleb + 2*pi)*180/pi;
        end
        pointsel(i+1,1) =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i+1,2),1,i+1);
        pointsel(i+1,2) =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i+1,2),2,i+1);
        pointsel(i+1,3) =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i+1,1),1,i+1);
        pointsel(i+1,4) =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i+1,1),2,i+1);
    else
        if anglea>0
            F.Data{NumbFileAnal}.angleatantemp(i) = (anglea - 2*pi)*180/pi;
        else
            F.Data{NumbFileAnal}.angleatantemp(i) = (anglea + 2*pi)*180/pi;
        end
        pointsel(i+1,1) =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i+1,1),1,i+1);
        pointsel(i+1,2) =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i+1,1),2,i+1);
        pointsel(i+1,3) =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i+1,2),1,i+1);
        pointsel(i+1,4) =
F.Data{NumbFileAnal}.CoordPerPlane(F.Data{NumbFileAnal}.MinDistCell(i+1,2),2,i+1);
    end
end
end
% calcul par somme entre chaque position jusqu'a anaphase -1, pris comme référence donc
ana - 2 dans angleatantemp
for i=1:F.Data{NumbFileAnal}.ANA-2
    F.Data{NumbFileAnal}.angleatan(i) =
sum(F.Data{NumbFileAnal}.angleatantemp(i:F.Data{NumbFileAnal}.ANA-2));
end
F.Data{NumbFileAnal}.angleatan(F.Data{NumbFileAnal}.ANA-1) = 0;
for i=F.Data{NumbFileAnal}.ANA-1:F.Data{NumbFileAnal}.NbPlaneCell-1
    F.Data{NumbFileAnal}.angleatan(i+1) =
sum(F.Data{NumbFileAnal}.angleatantemp(F.Data{NumbFileAnal}.ANA-1:i));
end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% calcul de l'angle cumulé au cours de la mitose

F.Data{NumbFileAnal}.Alphacumulabs(1) = 0;
for i=1:F.Data{NumbFileAnal}.NbPlaneCell - 1
    F.Data{NumbFileAnal}.Alphacumulabs(i+1) =

```

```

sum(abs(F.Data{NumbFileAnal}.angleatantemp(1:i)));
    end
    F.Data{NumbFileAnal}.Alphacumulabs = F.Data{NumbFileAnal}.Alphacumulabs -
F.Data{NumbFileAnal}.Alphacumulabs(F.Data{NumbFileAnal}.PLA);
    end
end
end

% fais le tracé de la mitose en 3D
F.h.net=findobj('tag','FIG_MultipleNewCalculus');
if ~isempty(F.h.net)
    delete(F.h.net(1:end))
end

F.h.net=openfig('FIG_MultipleNewCalculus');

F.gh.net=guihandles(F.h.net);
guidata(F.h.net,F.gh.net);

set(0,'tag','')
set(0,'unit','normalized')

set(F.h.net,'units','normalized')
set(F.h.net,'Position',[0 0 0.9 0.9])
set(F.h.net,'visible','on')

% fais le tracé de la cellule
CM=colormap;
hold on;
if DrawCell=='Y'

    for i=1:NbPlaneCell
        Plane=find(F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z1(:)>F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z1(p));
        if isempty(Plane)
            k=round(64*i/NbPlaneCell);
            if k==0
                k=1;
            end
            axes(F.gh.net.CellAxes)
            plot3(F.Data{NumbFileAnal}.Coord.X1(p:end),F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Y1(p:end),...
                F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z1(p:end),'color',CM(k,:),'marker','.', 'MarkerFaceColor',
CM(k,:))
        else
            k=round(64*i/NbPlaneCell);
            if k==0
                k=1;
            end
            axes(F.gh.net.CellAxes)
            plot3(F.Data{NumbFileAnal}.Coord.X1(p:Plane(1)-1),F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Y1(p:Plane(
1)-1),...
                F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z1(p:Plane(1)-1),'color',CM(k,:),'marker','.', 'MarkerFace
Color',CM(k,:))
            p=Plane(1);
            Plane=0;
        end
    end
end
end

maxZ=1;
for i=1:NumbFileAnal
    if maxZ<max(F.Data{i}.NbPlaneCell)
        maxZ=max(F.Data{i}.NbPlaneCell);
    end
end

% fais les settings pour les sliders de la figure FIG_Analyisicell

set(F.gh.net.slider1,'SliderStep',[1/maxZ,5/maxZ]);
set(F.gh.net.slider1,'min',1);
set(F.gh.net.slider1,'max',maxZ);
set(F.gh.net.slider1,'value',maxZ);
set(F.gh.net.slider2,'SliderStep',[1/maxZ,5/maxZ]);
set(F.gh.net.slider2,'min',1);
set(F.gh.net.slider2,'max',maxZ);

```

```

set(F.gh.net.slider2,'value',1);

if DrawHoechst=='Y'
    p=1;
    for i=1:NbPlaneCell1
        Plane=find(F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z2(:)>F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z2(p));
        if isempty(Plane)
            k=round(64*i/NbPlaneCell1);
            if k==0
                k=1;
            end
            axes(F.gh.net.CellAxes)
            plot3(F.Data{NumbFileAnal}.Coord.X2(p:end),F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Y2(p:end),F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z2(p:end),...
                'color',CM(k,:), 'marker','.', 'MarkerFaceColor',CM(k,:))
        else
            k=round(64*i/NbPlaneCell1);
            if k==0
                k=1;
            end
            axes(F.gh.net.CellAxes)
            plot3(F.Data{NumbFileAnal}.Coord.X2(p:Plane(1)-1),F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Y2(p:Plane(1)-1),F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Z2(p:Plane(1)-1),...
                'color',CM(k,:), 'marker','.', 'MarkerFaceColor',CM(k,:))
            p=Plane(1);
            Plane=0;
        end
    end
end
p=1;
daspect([RatioZ RatioZ 1])
view([45 45 45])
set(F.gh.net.edit1,'string',RatioZ);
set(F.gh.net.checkbox1,'value',1);
set(F.gh.net.checkbox2,'value',1);

if DrawBarycentre == 'Y'
    for i=1:NbPlaneCell
        k=round(64*i/NbPlaneCell);
        if k==0
            k=1;
        end
        plot3(F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Bary(i,1),F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Bary(i,2),i, 'marker', 'o', 'MarkerFaceColor',CM(k,:))
    end
    set(F.gh.net.checkbox3,'value',1);
else
    set(F.gh.net.checkbox3,'value',0);
end
if DrawBarycentreDNA == 'Y'
    for i=1: NbPlaneCell1
        k=round(64*i/ NbPlaneCell1);
        if k==0
            k=1;
        end
        plot3(F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,1),F.Data{NumbFileAnal}.Coord.BaryDNA(i,2),i, 'marker', 'o', 'MarkerFaceColor',[0 0 0])
    end
    set(F.gh.net.checkbox5,'value',1);
else
    set(F.gh.net.checkbox5,'value',0);
end
if DrawCircle=='Y'

    t = 0: 0.05 : 2 * pi;
    x = cos(t);
    y = sin(t);
    PlotZ = zeros(1,length(t));

    for i=10:NbPlaneCell-10
        axes(F.gh.net.CellAxes)
        plot3(F.Data{NumbFileAnal}.DistMoyDia(i)*x + F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Bary(i,1) , ...
            F.Data{NumbFileAnal}.DistMoyDia(i)*y + F.Data{NumbFileAnal}.Coord.Bary(i,2) , PlotZ+i);
    end
end

```

```

    set(F.gh.net.checkbox4,'value',1);
else
    set(F.gh.net.checkbox4,'value',0);
end

% Mets les noms dans le menu popup de la figure 3D et de la figure du plot des résultats
set(F.gh.net.popupmenu1,'string',F.Name);

% ouvre la figure pour faire les plots
F.h1.net=findobj('tag','FIG_PlotResult');
if ~isempty(F.h1.net)
    delete(F.h1.net(1:end))
end
F.h1.net=openfig('FIG_PlotResult.fig');
F.gh1.net=guihandles(F.h1.net);
guidata(F.h1.net,F.gh1.net);

% Mets les noms dans le menu popup de la figure du plot des résultats
set(F.gh1.net.popupmenu1,'string',F.Name);
set(0,'tag','')
set(0,'unit','normalized')
set(F.h1.net,'units','normalized')
set(F.h1.net,'Position',[0 0 0.9 0.9])
set(F.h1.net,'visible','on')

```

Programme pour la représentation 3D des comportements du fuseau

```

function TRI_ACT_MultipleNewCalculus(Action)

Action

global F

%set(0,'tag','')
figure(F.h.net);
Valuepop = get(F.gh.net.popupmenu1,'Value');
F.Data{Valuepop}.Zplane = get(F.gh.net.slider1,'value');

CM=colormap;
colorplot=[153/255 56/255 203/255;58/255 125/255 235/255;113/255 226/255 63/255;241/255 17/255
49/255;...
75/255 45/255 45/255];
switch (Action)

case 'Popup'
StringPop = get(F.gh.net.popupmenu1,'String');
Valuepop = get(F.gh.net.popupmenu1,'Value');
StringPop(Valuepop)

case 'SelectPlane'
ZLimitUp=round(get(F.gh.net.slider1,'value'));
ZLimitDown=round(get(F.gh.net.slider2,'value'));
axes(F.gh.net.CellAxes)
ClearH=get(F.gh.net.CellAxes,'children');
delete(ClearH)
Var =
[F.gh.net.checkbox1,F.gh.net.checkbox2,F.gh.net.checkbox3,F.gh.net.checkbox4,F.gh.net.checkbox5,F.gh
.net.checkbox6];
Val = get(Var,'Value');
for ZLoop=ZLimitDown:ZLimitUp
ZIndex1=find(F.Data{Valuepop}.Coord.Z1(:)==ZLoop);
ZIndex2=find(F.Data{Valuepop}.Coord.Z2(:)==ZLoop);
if ~isempty(ZIndex1)
k=round(64*ZLoop/F.Data{Valuepop}.NbPlaneCell);
if k==0
k=1;
end
if ZLoop<F.Data{Valuepop}.NEB
p=1;
elseif ZLoop>=F.Data{Valuepop}.NEB & ZLoop<F.Data{Valuepop}.PLA
p=2;
elseif ZLoop>=F.Data{Valuepop}.PLA & ZLoop<F.Data{Valuepop}.ANA
p=3;
elseif ZLoop>=F.Data{Valuepop}.ANA & ZLoop<F.Data{Valuepop}.CYTO
p=4;
elseif ZLoop>=F.Data{Valuepop}.CYTO
p=5;
end
if Val{1}(1) == 1
plot3(F.Data{Valuepop}.Coord.X1(ZIndex1),F.Data{Valuepop}.Coord.Y1(ZIndex1),F.Data{V
aluepop}.Coord.Z1(ZIndex1),'color',colorplot(p,:),...
'marker','.', 'MarkerFaceColor',colorplot(p,:))
end
if Val{2}(1) == 1
plot3(F.Data{Valuepop}.Coord.X2(ZIndex2),F.Data{Valuepop}.Coord.Y2(ZIndex2),F.Data{V
aluepop}.Coord.Z2(ZIndex2),'color',colorplot(p,:),...
'marker','.', 'MarkerFaceColor',colorplot(p,:))
end
if Val{3}(1) == 1
plot3(F.Data{Valuepop}.Coord.Bary(ZLoop,1),F.Data{Valuepop}.Coord.Bary(ZLoop,2),ZLo
op,'marker','o', 'MarkerFaceColor',CM(k,:))
end
if Val{4}(1) == 1
t = 0: 0.05 : 2 * pi;
x = cos(t);
y = sin(t);
PlotZ = zeros(1,length(t));

axes(F.gh.net.CellAxes)
plot3(F.Data{Valuepop}.DistMoyDia(ZLoop)*x + F.Data{Valuepop}.Coord.Bary(ZLoop,1) ,

```

```

...
    F.Data{Valuepop}.DistMoyDia(ZLoop)*y + F.Data{Valuepop}.Coord.Bary(ZLoop,2) ,
PlotZ+ZLoop);
    end
    if Val{5}(1) == 1
        plot3(F.Data{Valuepop}.Coord.BaryDNA(ZLoop,1),F.Data{Valuepop}.Coord.BaryDNA(ZLoop,2
),ZLoop,'marker','o','MarkerFaceColor',[0 0 0])
    end
    %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
    if Val{6}(1) == 1
        % plot selected points
        plot3(F.Data{Valuepop}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{Valuepop}.MinDist(ZLoop,1),1,ZLoop),.
..
        F.Data{Valuepop}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{Valuepop}.MinDist(ZLoop,1),2,ZLoop),ZLo
op,'ro')
        plot3(F.Data{Valuepop}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{Valuepop}.MinDist(ZLoop,2),1,ZLoop),.
..
        F.Data{Valuepop}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{Valuepop}.MinDist(ZLoop,2),2,ZLoop),ZLo
op,'ro')
        plot3(F.Data{Valuepop}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{Valuepop}.MinDist(ZLoop,3),1,ZLoop),.
..
        F.Data{Valuepop}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{Valuepop}.MinDist(ZLoop,3),2,ZLoop),ZLo
op,'go')
        plot3(F.Data{Valuepop}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{Valuepop}.MinDist(ZLoop,4),1,ZLoop),.
..
        F.Data{Valuepop}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{Valuepop}.MinDist(ZLoop,4),2,ZLoop),ZLo
op,'go')
        plot3(F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,1),1,ZLoop),
..
        F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,1),2,ZLoop),ZL
oop,'ro')
        plot3(F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,2),1,ZLoop),
..
        F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,2),2,ZLoop),ZL
oop,'ro')
        plot3(F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,3),1,ZLoop),
..
        F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,3),2,ZLoop),ZL
oop,'go')
        plot3(F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,4),1,ZLoop),
..
        F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,4),2,ZLoop),ZL
oop,'go')
        line([F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,1),1,ZLoop)...
        F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,2),1,ZLoop)].
..
        ,[F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,1),2,ZLoop) ...
        F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,2),2,ZLoop)],{ZLoop
ZLoop},'color',...
        [0.5 0 0],'marker','.'); % dark red
        line([F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,3),1,ZLoop)...
        F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,4),1,ZLoop)].
..
        ,[F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,3),2,ZLoop) ...
        F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,4),2,ZLoop)],{ZLoop
ZLoop},'color',...
        [1 0 1],'marker','.'); % magenta
        %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
    end
    RatioZ = str2double(get(F.gh.net.edit1,'string'));
    daspect([RatioZ RatioZ 1]);
end
end
case 'Rotate'
    rotate3d on
case 'Up'
    ZLimitUp=round(get(F.gh.net.slider1,'value')) + 1;
    ZLimitDown=round(get(F.gh.net.slider2,'value')) + 1;
    if ZLimitUp > F.Data{Valuepop}.NbPlaneCell - 1
        ZLimitUp = F.Data{Valuepop}.NbPlaneCell

```

```

end
if ZLimitDown > F.Data{Valuepop}.NbPlaneCell - 2
    ZLimitDown = F.Data{Valuepop}.NbPlaneCell - 1
end
set(F.gh.net.slider1,'value',ZLimitUp);
set(F.gh.net.slider2,'value',ZLimitDown);
axes(F.gh.net.CellAxes)
ClearH=get(F.gh.net.CellAxes,'children');
delete(ClearH)
Var =
[F.gh.net.checkbox1,F.gh.net.checkbox2,F.gh.net.checkbox3,F.gh.net.checkbox4,F.gh.net.checkbox5,F.gh
.net.checkbox6];
Val = get(Var,'Value');

for ZLoop=ZLimitDown:ZLimitUp
    ZIndex1=find(F.Data{Valuepop}.Coord.Z1(:)==ZLoop);
    ZIndex2=find(F.Data{Valuepop}.Coord.Z2(:)==ZLoop);
    if ~isempty(ZIndex1)
        k=round(64*ZLoop/F.Data{Valuepop}.NbPlaneCell);
        if k==0
            k=1;
        end
        if ZLoop<F.Data{Valuepop}.NEB
            p=1;
        elseif ZLoop>=F.Data{Valuepop}.NEB & ZLoop<F.Data{Valuepop}.PLA
            p=2;
        elseif ZLoop>=F.Data{Valuepop}.PLA & ZLoop<F.Data{Valuepop}.ANA
            p=3;
        elseif ZLoop>=F.Data{Valuepop}.ANA & ZLoop<F.Data{Valuepop}.CYTO
            p=4
        elseif ZLoop>=F.Data{Valuepop}.CYTO
            p=5;
        end
        if ZLoop<F.Data{Valuepop}.NEB
            p=1;
        elseif ZLoop>=F.Data{Valuepop}.NEB & ZLoop<F.Data{Valuepop}.PLA
            p=2;
        elseif ZLoop>=F.Data{Valuepop}.PLA & ZLoop<F.Data{Valuepop}.ANA
            p=3;
        elseif ZLoop>=F.Data{Valuepop}.ANA & ZLoop<F.Data{Valuepop}.CYTO
            p=4
        elseif ZLoop>=F.Data{Valuepop}.CYTO
            p=5;
        end
        %%%%%%%%%%%
        if Val{1}(1) == 1
            plot3(F.Data{Valuepop}.Coord.X1(ZIndex1),F.Data{Valuepop}.Coord.Y1(ZIndex1),F.Data{V
aluepop}.Coord.Z1(ZIndex1),'color',colorplot(p,:),...
                'marker','.', 'MarkerFaceColor',colorplot(p,:))
        end
        if Val{2}(1) == 1
            plot3(F.Data{Valuepop}.Coord.X2(ZIndex2),F.Data{Valuepop}.Coord.Y2(ZIndex2),F.Data{V
aluepop}.Coord.Z2(ZIndex2),'color',colorplot(p,:),...
                'marker','.', 'MarkerFaceColor',colorplot(p,:))
        end
        if Val{3}(1) == 1
            plot3(F.Data{Valuepop}.Coord.Bary(ZLoop,1),F.Data{Valuepop}.Coord.Bary(ZLoop,2),ZLo
op,'marker','o', 'MarkerFaceColor',CM(k,:))
        end
        if Val{4}(1) == 1
            t = 0: 0.05 : 2 * pi;
            x = cos(t);
            y = sin(t);
            PlotZ = zeros(1,length(t));

            axes(F.gh.net.CellAxes)
            plot3(F.Data{Valuepop}.DistMoyDia(ZLoop)*x + F.Data{Valuepop}.Coord.Bary(ZLoop,1) ,
            ...
                F.Data{Valuepop}.DistMoyDia(ZLoop)*y + F.Data{Valuepop}.Coord.Bary(ZLoop,2) ,
            PlotZ+ZLoop);
        end
        if Val{5}(1) == 1
            plot3(F.Data{Valuepop}.Coord.BaryDNA(ZLoop,1),F.Data{Valuepop}.Coord.BaryDNA(ZLoop,2

```



```

set(F.gh.net.slider2,'value',ZLimitDown);
axes(F.gh.net.CellAxes)
ClearH=get(F.gh.net.CellAxes,'children');
delete(ClearH)
Var =
[F.gh.net.checkbox1,F.gh.net.checkbox2,F.gh.net.checkbox3,F.gh.net.checkbox4,F.gh.net.checkbox5,F.gh
.net.checkbox6];
Val = get(Var,'Value');

for ZLoop=ZLimitDown:ZLimitUp
ZIndex1=find(F.Data{Valuepop}.Coord.Z1(:)==ZLoop);
ZIndex2=find(F.Data{Valuepop}.Coord.Z2(:)==ZLoop);
if ~isempty(ZIndex1)
k=round(64*ZLoop/F.Data{Valuepop}.NbPlaneCell);
if k==0
k=1;
end

if ZLoop<F.Data{Valuepop}.NEB
p=1;
elseif ZLoop>=F.Data{Valuepop}.NEB & ZLoop<F.Data{Valuepop}.PLA
p=2;
elseif ZLoop>=F.Data{Valuepop}.PLA & ZLoop<F.Data{Valuepop}.ANA
p=3;
elseif ZLoop>=F.Data{Valuepop}.ANA & ZLoop<F.Data{Valuepop}.CYTO
p=4;
elseif ZLoop>=F.Data{Valuepop}.CYTO
p=5;
end
if Val{1}(1) == 1
plot3(F.Data{Valuepop}.Coord.X1(ZIndex1),F.Data{Valuepop}.Coord.Y1(ZIndex1),F.Data{V
aluepop}.Coord.Z1(ZIndex1),'color',colorplot(p,:),...
'marker','.', 'MarkerFaceColor',colorplot(p,:))
end
if Val{2}(1) == 1
plot3(F.Data{Valuepop}.Coord.X2(ZIndex2),F.Data{Valuepop}.Coord.Y2(ZIndex2),F.Data{V
aluepop}.Coord.Z2(ZIndex2),'color',colorplot(p,:),...
'marker','.', 'MarkerFaceColor',colorplot(p,:))
end
if Val{3}(1) == 1
plot3(F.Data{Valuepop}.Coord.Bary(ZLoop,1),F.Data{Valuepop}.Coord.Bary(ZLoop,2),ZLo
op,'marker','o', 'MarkerFaceColor',CM(k,:))
end
if Val{4}(1) == 1
t = 0: 0.05 : 2 * pi;
x = cos(t);
y = sin(t);
PlotZ = zeros(1,length(t));

axes(F.gh.net.CellAxes)
plot3(F.Data{Valuepop}.DistMoyDia(ZLoop)*x + F.Data{Valuepop}.Coord.Bary(ZLoop,1) ,
...
F.Data{Valuepop}.DistMoyDia(ZLoop)*y + F.Data{Valuepop}.Coord.Bary(ZLoop,2) ,
PlotZ+ZLoop);

end
if Val{5}(1) == 1
plot3(F.Data{Valuepop}.Coord.BaryDNA(ZLoop,1),F.Data{Valuepop}.Coord.BaryDNA(ZLoop,2
),ZLoop,'marker','o', 'MarkerFaceColor',[0 0 0])
end
%%%%%%%%%%%%%%
if Val{6}(1) == 1
line([F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,1),1,ZLoop)...
F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,2),1,ZLoop)].
...
,[F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,1),2,ZLoop) ...
F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,2),2,ZLoop)], [ZLoop
ZLoop], 'color',...
[0.5 0 0], 'marker','.'); % dark red
line([F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,3),1,ZLoop)...
F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,4),1,ZLoop)].
...
,[F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,3),2,ZLoop) ...
F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,4),2,ZLoop)], [ZLoop
ZLoop], 'color',...

```

```

[1 0 1], 'marker', '.'); % magenta
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
plot3(F.Data{Valuepop}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{Valuepop}.MinDist(ZLoop,1),1,ZLoop),.
..
F.Data{Valuepop}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{Valuepop}.MinDist(ZLoop,1),2,ZLoop),ZLo
op, 'ro')
plot3(F.Data{Valuepop}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{Valuepop}.MinDist(ZLoop,2),1,ZLoop),.
..
F.Data{Valuepop}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{Valuepop}.MinDist(ZLoop,2),2,ZLoop),ZLo
op, 'ro')
plot3(F.Data{Valuepop}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{Valuepop}.MinDist(ZLoop,3),1,ZLoop),.
..
F.Data{Valuepop}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{Valuepop}.MinDist(ZLoop,3),2,ZLoop),ZLo
op, 'go')
plot3(F.Data{Valuepop}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{Valuepop}.MinDist(ZLoop,4),1,ZLoop),.
..
F.Data{Valuepop}.CoordPerPlaneDNA(F.Data{Valuepop}.MinDist(ZLoop,4),2,ZLoop),ZLo
op, 'go')

plot3(F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,1),1,ZLoop),
...
F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,1),2,ZLoop),ZL
oop, 'ro')
plot3(F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,2),1,ZLoop),
...
F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,2),2,ZLoop),ZL
oop, 'ro')
plot3(F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,3),1,ZLoop),
...
F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,3),2,ZLoop),ZL
oop, 'go')
plot3(F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,4),1,ZLoop),
...
F.Data{Valuepop}.CoordPerPlane(F.Data{Valuepop}.MinDistCell(ZLoop,4),2,ZLoop),ZL
oop, 'go')
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
end
end
end
RatioZ = str2double(get(F.gh.net.edit1, 'string'));
daspect([RatioZ RatioZ 1]);

case 'Plot'

CM=colormap;
DistCellDNA = F.Data{Valuepop}.DistCellDNA;
DistRatio = F.Data{Valuepop}.DistRatio;
DistRatio1 = F.Data{Valuepop}.DistRatio1;
SumDia = F.Data{Valuepop}.SumDia;
DistRatioDNA = F.Data{Valuepop}.DistRatioDNA;
Angle = F.Data{Valuepop}.Spindleangle;
Anglecorr = F.Data{Valuepop}.Spindleanglecorr;
Angleana = F.Data{Valuepop}.Alpha;
Angleatan = F.Data{Valuepop}.angleatan;
% Anglecumul = F.Data{Valuepop}.Alphacumul;
Anglecumulabs = F.Data{Valuepop}.Alphacumulabs;
NEB = F.Data{Valuepop}.NEB;
PLA = F.Data{Valuepop}.PLA;
ANA = F.Data{Valuepop}.ANA;
CYTO = F.Data{Valuepop}.CYTO;
NbPlaneCell = F.Data{Valuepop}.NbPlaneCell;
h=figure;

set(h, 'name', F.Name{Valuepop});
subplot(2,3,1),
hold on
plot((1:NEB),DistCellDNA(1:NEB), ':', 'color', [153/255 56/255 203/255]);
plot((NEB:PLA),DistCellDNA(NEB:PLA), ':', 'color', [58/255 125/255 235/255]);
plot((PLA:ANA),DistCellDNA(PLA:ANA), 'color', [113/255 226/255 63/255], 'marker', '.');
plot((ANA:CYTO),DistCellDNA(ANA:CYTO), ':', 'color', [241/255 17/255 49/255]);
plot((CYTO:NbPlaneCell),DistCellDNA(CYTO:NbPlaneCell), ':', 'color', [75/255 45/255 45/255]);
xlabel(['D centroide-cellule /' 'centroide-masse chromosomique'])

maxsec = max(SumDia(PLA:ANA)) + 0.2;
subplot(2,3,2),

```

```

hold on
plot((1:NEB),SumDia(1:NEB),':','color',[153/255 56/255 203/255]);
plot((NEB:PLA),SumDia(NEB:PLA),':','color',[58/255 125/255 235/255]);
plot((PLA:ANA),SumDia(PLA:ANA),'color',[113/255 226/255 63/255],'marker','.');
plot((ANA:CYTO),SumDia(ANA:CYTO),':','color',[241/255 17/255 49/255]);
plot((CYTO:NbPlaneCell),SumDia(CYTO:NbPlaneCell),':','color',[75/255 45/255 45/255]);
axis([0 NbPlaneCell 0 maxsec])
xlabel('ratio écart forme cellule et rayon moyen')

subplot(2,3,3),
hold on
plot((1:NEB),DistRatioDNA(1:NEB),':','color',[153/255 56/255 203/255]);
plot((NEB:PLA),DistRatioDNA(NEB:PLA),':','color',[58/255 125/255 235/255]);
plot((PLA:ANA),DistRatioDNA(PLA:ANA),'color',[113/255 226/255 63/255],'marker','.');
plot((ANA:CYTO),DistRatioDNA(ANA:CYTO),':','color',[241/255 17/255 49/255]);
plot((CYTO:NbPlaneCell),DistRatioDNA(CYTO:NbPlaneCell),':','color',[75/255 45/255 45/255]);
axis([0 NbPlaneCell 0 1])
xlabel('Ratio axe court-axe long de la masse chromosomique')

maxqua = max(DistRatio(PLA:ANA)) + 0.5;
subplot(2,3,4),
hold on
plot((1:NEB),DistRatio(1:NEB),':','color',[153/255 56/255 203/255]);
plot((NEB:PLA),DistRatio(NEB:PLA),':','color',[58/255 125/255 235/255]);
plot((PLA:ANA),DistRatio(PLA:ANA),'color',[113/255 226/255 63/255],'marker','.');
plot((ANA:CYTO),DistRatio(ANA:CYTO),':','color',[241/255 17/255 49/255]);
plot((CYTO:NbPlaneCell),DistRatio(CYTO:NbPlaneCell),':','color',[75/255 45/255 45/255]);
axis([0 NbPlaneCell 0 maxqua])
xlabel('ratio distance axe court et bord cellule')

mintemp(1) = min(Angleana(PLA:ANA));
mintemp(2) = min(Angleatan(PLA:ANA));
miny = min(mintemp) - 5;
maxtemp(1) = max(Angleana(PLA:ANA));
maxtemp(2) = max(Angleatan(PLA:ANA));
maxy = max(maxtemp)+ 5;

subplot(2,3,5),
hold on
plot((1:NEB),Angleatan(1:NEB),':','color',[153/255 56/255 203/255]);
plot((NEB:PLA),Angleatan(NEB:PLA),':','color',[58/255 125/255 235/255]);
plot((PLA:ANA-1),Angleatan(PLA:ANA-1),'color',[113/255 226/255 63/255],'marker','.');
plot((ANA-1:CYTO),Angleatan(ANA-1:CYTO),':','color',[241/255 17/255 49/255]);
plot((CYTO:NbPlaneCell),Angleatan(CYTO:NbPlaneCell),':','color',[75/255 45/255 45/255]);
axis([0 NbPlaneCell miny maxy])
xlabel(['angle for the spindle with angle at';' anaphase,atan fc used for calculus'])

subplot(2,3,6),
hold on
plot((1:NEB),Anglecumulabs(1:NEB),':','color',[153/255 56/255 203/255]);
plot((NEB:PLA),Anglecumulabs(NEB:PLA),':','color',[58/255 125/255 235/255]);
plot((PLA:ANA),Anglecumulabs(PLA:ANA),'color',[113/255 226/255 63/255],'marker','.');
plot((ANA:CYTO),Anglecumulabs(ANA:CYTO),':','color',[241/255 17/255 49/255]);
plot((CYTO:NbPlaneCell-1),Anglecumulabs(CYTO:NbPlaneCell-1),':','color',[75/255 45/255 45/255]);
xlabel('cumulated angle for the spindle')
end

```

## Programme Calcul Co-organisation

```
function [sizeclustercol,overlap] = LocIntens_global
% !!! changer le nom de sauvegarde des fichiers à la fin du script
namesave = 'APC';
Directory = 'G:\Boulot\Analysis\Analysis_Loc\APC\';
eval(['cd ',Directory]);
for k=10:10
    FileName=[namesave, '_',sprintf('%02.f',k),'_NuMA_',sprintf('%02.f',1),'.log'];
    if exist(FileName)==2

        nbplane=0;
        Igs=[];
        Igsg=[];
        Igcs=[];
        Igcsг=[];
        % plot avec un rond sur l'ensemble des plans
        for i=1:10
            FileName=[namesave, '_',sprintf('%02.f',k),'_NuMA_',sprintf('%02.f',i),'.log'];
            if exist(FileName)==2
                [Xg{i},Yg{i},Zg{i},Ig{i}]=textread(FileName,'%f%f%f%d','delimiter','\t');
                FileNamec=[namesave, '_',sprintf('%02.f',k),'_CLIP_',sprintf('%02.f',i),'.log'];
                [Xgc{i},Ygc{i},Zgc{i},Igc{i}]=textread(FileNamec,'%f%f%f%d','delimiter','\t');
                nbplane = nbplane+1;
            end
        end
        for i=1:nbplane
            for j=1:length(Ig{i})
                Igs{i}(j)=(Ig{i}(j)-min(Ig{i}))/((max(Ig{i})-min(Ig{i}))*100);
                Igcs{i}(j)=(Igc{i}(j)-min(Igc{i}))/((max(Igc{i})-min(Igc{i}))*100);
            end
        end
        polename = [namesave, '_',sprintf('%02.f',k),'_poles.log'];
        [Xpa,Ypa,Zpa,Xpb,Ypb,Zpb] = textread(polename,'%f%f%f%f%f%f','delimiter','\t');

        % plot sur l'ensemble des plans avec scaling des valeurs par rapport au min et max de
        l'ensemble des plans et non
        % plan par plan

        MaxIgz=0;
        MinIgz=100000;
        MaxIgcз=0;
        MinIgcз=100000;
        for i=1:nbplane
            if max(Ig{i}(:))>MaxIgz
                MaxIgz=max(Ig{i}(:));
            end
            if min(Ig{i}(:))<MinIgz
                MinIgz=min(Ig{i}(:));
            end
            if max(Igc{i}(:))>MaxIgcз
                MaxIgcз=max(Igc{i}(:));
            end
            if min(Igc{i}(:))<MinIgcз
                MinIgcз=min(Igc{i}(:));
            end
        end
        for i=1:nbplane
            for j=1:length(Ig{i})
                Igsg{i}(j)=(Ig{i}(j)-MinIgz)/(MaxIgz-MinIgz)*100;
                Igcsг{i}(j)=(Igc{i}(j)-MinIgcз)/(MaxIgcз-MinIgcз)*100;
            end
        end
        for i=1:nbplane
            sizeplane{k}(i)=length(Igsg{i});
        end
        % sélection des clusters sur deux critères: intensité du signal (supérieure à 20% pour NuMA
        et 40% pour CLIP), et longueur (au moins 3 pixels),

        % NuMA
        clusterN=zeros(nbplane,max(sizeplane{k}));
        for i=1:nbplane
            indexN = find(Igsg{i}(:)>20);
            diffN = diff(indexN);
```

```

j=1;
while j<length(diffN)-2
    if diffN(j:j+2)==1
        endcluster = diffN(j:end)>1;
        firstN=find(endcluster==1);
        if isempty(firstN)
            firstN = length(diffN)+2-j;
        end
        clusterN(i,indexN(j):indexN(j+firstN(1)-1)) = 1;
        j=j+firstN(1);
        clear firstN endcluster
    else
        j=j+1;
    end
end
end

% CLIP
clusterC=zeros(nbplane,max(sizeplane{k}));
for i=1:nbplane
    indexC = find(Igcsg{i}(:)>40);
    diffC = diff(indexC);
    j=1;
    while j<length(diffC)-2
        if diffC(j:j+2)==1
            endcluster = diffC(j:end)>1;
            firstC=find(endcluster==1);
            if isempty(firstC)
                firstC = length(diffC)+2-j;
            end
            clusterC(i,indexC(j):indexC(j+firstC(1)-1)) = 1;
            j=j+firstC(1);
            clear firstC endcluster
        else
            j=j+1;
        end
    end
end

% correction des clusters: si deux clusters sont séparés d'un point, le point est mis a 1
pour que les
% deux clusters ne forment qu'un cluster

% NuMA
for i=1:nbplane
    findintercluster = find(clusterN(i,:) == 0);
    for j=1:length(findintercluster)
        if findintercluster(j) == 1
            if clusterN(i,end) == 1 && clusterN(i,j+1) == 1 % a limite debut et fin
                clusterN(i,j) = 1;
            end
        elseif findintercluster(j) == length(clusterN(i,:))
            if clusterN(i,j-1) == 1 && clusterN(i,1) == 1
                clusterN(i,j) = 1;
            end
        else
            if clusterN(i,findintercluster(j)-1) == 1 && clusterN(i,findintercluster(j)+1)
                disp('fusion deux clusters NuMA')
                clusterN(i,j) = 1;
            end
        end
    end
end

% CLIP
for i=1:nbplane
    findintercluster = find(clusterC(i,:) == 0);
    for j=1:length(findintercluster)
        if findintercluster(j) == 1
            if clusterC(i,end) == 1 && clusterC(i,j+1) == 1 % a limite debut et fin
                clusterC(i,j) = 1;
            end
        elseif findintercluster(j) == length(clusterC(i,:))
            if clusterC(i,j-1) == 1 && clusterC(i,1) == 1

```

```

        clusterC(i,j) = 1;
    end
else
    if clusterC(i,findintercluster(j)-1) == 1 && clusterC(i,findintercluster(j)+1)
== 1
        disp('fusion deux clusters CLIP')
        clusterC(i,j) = 1;
    end
end
end
end

%plot sur l'ensemble des plans avec mix des couleurs en fonction de l'intensité de chacun et
sélection des points si appartient a un cluster %
figure;
hold on
for i=1:nbplane
    for j=1:length(Xg{i})
        if clusterN(i,j)==1 && clusterC(i,j)==1
            Iplot = Igsg{i}(j)/7 + Igcs{g{i}(j)}/7;
            if Iplot==0
                Iplot=1;
            end
            plot3(Xg{i}(j),Yg{i}(j),i,'marker','o','markersize',Iplot,'Color',[0 0
0], 'MarkerFaceColor',[Igcs{g{i}(j)}/100 Igsg{i}(j)/100 0])
        elseif clusterN(i,j)==1 && clusterC(i,j)==0
            Iplot = Igsg{i}(j)/7;
            if Iplot==0
                Iplot=1;
            end
            plot3(Xg{i}(j),Yg{i}(j),i,'marker','o','markersize',Iplot,'Color',[0 0
0], 'MarkerFaceColor',[0 Igsg{i}(j)/100 0])
        elseif clusterN(i,j)==0 && clusterC(i,j)==1
            Iplot = Igcs{g{i}(j)}/7;
            if Iplot==0
                Iplot=1;
            end
            plot3(Xg{i}(j),Yg{i}(j),i,'marker','o','markersize',Iplot,'Color',[0 0
0], 'MarkerFaceColor',[Igcs{g{i}(j)}/100 0 0])
        else
            Iplot=1;
            plot3(Xg{i}(j),Yg{i}(j),i,'marker','o','markersize',Iplot,'Color',[0 0
0], 'MarkerFaceColor',[0 0 0])
        end
    end
end
if (Zpa - Zg{1}(1))==0
    Zpa = 1;
else
    Zpa = (Zpa - Zg{1}(1))*2 + 1;
end
if (Zpb - Zg{1}(1))==0
    Zpb = 1;
else
    Zpb = (Zpb - Zg{1}(1))*2 + 1;
end
plot3(Xpa,Ypa,Zpa,'marker','o','markersize',20,'MarkerFaceColor','g')
plot3(Xpb,Ypb,Zpb,'marker','o','markersize',20,'MarkerFaceColor','g')
axis([0 35 0 35 0 nbplane])

% quantification de la co-organisation
% rapport de la taille des clusters mis bout a bout sur la taille du
% premier point du premier cluster au dernier point du dernier, et sur la
% taille totale de la membrane

% NuMA
for i=1:nbplane
    temp=find(clusterN(i,:)==1);
    if ~isempty(temp)
        sizetotalclusterN(k,i) = temp(end)-temp(1)+1;
        lengthclusterN(k,i) = length(temp);
        lengthtotalN(k,i) = sizeplane{k}(i);
        orgN(k,i) = (lengthclusterN(k,i) / lengthtotalN(k,i)) * 100;
        orgcluN(k,i) = (sizetotalclusterN(k,i) / lengthtotalN(k,i)) * 100;
    end
end

```

```

end

% CLIP
for i=1:nbplane
    temp=find(clusterC(i,:)==1);
    if ~isempty(temp)
        sizetotalclusterC(k,i) = temp(end)-temp(1)+1;
        lengthclusterC(k,i) = length(temp);
        lengthtotalC(k,i) = sizeplane{k}(i);
        orgC(k,i) = (lengthclusterC(k,i) / lengthtotalC(k,i)) * 100;
        orgcluC(k,i) = (sizetotalclusterC(k,i) / lengthtotalC(k,i)) * 100;
    end
end

% quantification de la co-organisation:
% nombre et taille des clusters dans chacun des canaux par rapport a la taille %
de la membrane
% nbr de points partagés et nbr de points du cluster de chacun des
% marquages

% NuMA
for i=1:nbplane
    temp=find(clusterN(i,:)==1);
    diffcluster=diff(temp);
    loccluster=find(diffcluster>1);
    tempA=[];
    tempA(2:length(loccluster)+1) = loccluster;
    tempA(end+1) = length(temp);
    sizeclusterabsN{k}{i} = diff(tempA);
    sizeclusterN{k}{i} = (diff(tempA)/sizeplane{k}(i)) * 100;
    nbclusterN{k}{i} = length(loccluster)+1;
end

% CLIP
for i=1:nbplane
    temp=find(clusterC(i,:)==1);
    diffcluster=diff(temp);
    loccluster=find(diffcluster>1);
    tempA=[];
    tempA(2:length(loccluster)+1) = loccluster;
    tempA(end+1) = length(temp);
    sizeclusterabsC{k}{i} = diff(tempA);
    sizeclusterC{k}{i} = (diff(tempA)/sizeplane{k}(i)) * 100;
    nbclusterC{k}{i} = length(loccluster)+1;
end

% recherche de l'overlap entre les clusters de NuMA et CLIP
% la terminologie est mauvaise : overlap désigne la taille
% totale du cluster et
% sizeclustercol désigne l'overlap entre les deux signaux

for i=1:nbplane
    r=1;
    tempN=find(clusterN(i,:)==1);
    tempC=find(clusterC(i,:)==1);
    locN = find(diff(tempN)>1);
    locC = find(diff(tempC)>1);
    if ~isempty(tempN) && ~isempty(tempC) % il y a au moins un cluster dans
NuMA et dans CLIP
        if numel(locN) == 0 % il n'y a qu'un clusterNuMA
            diffcluster = clusterN(i,tempN(1):tempN(end)) - clusterC(i,tempN(1):tempN(end));
            ordiff=sort(diffcluster);
            if ordiff(1)==0 % il y a au moins un point commun du
cluster NuMA dans le cluster CLIP
                tempfind = find(diffcluster==0); % cherche les points communs au deux
% pour trouver si il y a plus d'un cluster CLIP dans le cluster NuMA
                tempX = find(diffcluster==0);
                tempZ = diff(tempX);
                findcluster = find(tempZ>1);
                if ~isempty(findcluster) % il y a plus d'un cluster CLIP dans le
cluster NuMA
                    %il y a forcément plusieurs clusters CLIP d'ou cette partie du code
réutilisée

```

```

for j=1: numel(locC)+1      % il y a plusieurs clusters CLIP
    if j==1
        clustertemp = tempC(1) : tempC(locC(j));
        if clustertemp(1)>tempN(tempfind(1))
            tryfind = find(clustertemp(1) == tempN);
        else
            tryfind = find(clustertemp == tempN(1));
        end
        if ~isempty(tryfind)
            sizeclustercolmulC{k}(i,r) = length(clustertemp);
            firstC = tempC(1);
            lastC = tempC(locC(j));
        end
    elseif j==numel(locC)+1
        clustertemp = tempC(locC(end)+1) : tempC(end);
        if clustertemp(1)>tempN(tempfind(1))
            tryfind = find(clustertemp(1) == tempN);
        else
            tryfind = find(clustertemp == tempN(1));
        end
        if ~isempty(tryfind)
            sizeclustercolmulC{k}(i,r) = length(clustertemp);
            firstC = tempC(locC(end)+1);
            lastC = tempC(end);
        end
    else
        clustertemp = tempC(locC(j-1)+1) : tempC(locC(j));
        if clustertemp(1)>tempN(tempfind(1))
            tryfind = find(clustertemp(1) == tempN);
        else
            tryfind = find(clustertemp == tempN(1));
        end
        if ~isempty(tryfind)
            sizeclustercolmulC{k}(i,r) = length(clustertemp);
            firstC = tempC(locC(j-1)+1);
            lastC = tempC(locC(j));
        end
    end
    if ~isempty(tryfind)
        sizeclustercolmul{k}(i,r) = length(tempfind);          %
        sizeclustercolmulN{k}(i,r) = length(diffcluster);    % remet
        if firstN<firstC
            firstpoint = firstN;
        else
            firstpoint = firstC;
        end
        if lastN<lastC
            lastpoint = lastC;
        else
            lastpoint = lastN;
        end
        overlapmul{k}(i,r) = lastpoint - firstpoint + 1;
        r=r+1;
    end
    clear tryfind
end
else % il n'y a qu'un cluster CLIP qui overlap
    avec le cluster NuMA
    sizeclustercol{k}(i,1) = length(tempfind);
    sizeclustercolN{k}(i,1) = length(diffcluster);
    if numel(locC)==0      % il y a un seul cluster CLIP
        clustertemp = tempC;
        tryfind = find(clustertemp == tempN(tempfind(1)));
        if ~isempty(tryfind)
            sizeclustercolC{k}(i,1) = length(clustertemp);
            firstC = tempC(1);
            lastC = tempC(end);
            firstN = tempN(1);
            lastN = tempN(end);
            if firstN<firstC

```

```

        firstpoint = firstN;
    else
        firstpoint = firstC;
    end
    if lastN<lastC
        lastpoint = lastC;
    else
        lastpoint = lastN;
    end
    overlap{k}(i,1) = lastpoint - firstpoint + 1;
end
end
else % il y a plusieurs cluster CLIP mais un seul co-organise avec NuMA
for j=1:numel(locC)+1
    if j==1
        clustertemp = tempC(1) : tempC(locC(j));
        tryfind = find(clustertemp == tempN(tempfind(1)));
        if ~isempty(tryfind)
            sizeclustercolC{k}(i,1) = length(clustertemp);
            firstC = tempC(1);
            lastC = tempC(locC(j));
        end
    elseif j==numel(locC)+1
        clustertemp = tempC(locC(end)+1) : tempC(end);
        tryfind = find(clustertemp == tempN(tempfind(1)));
        if ~isempty(tryfind)
            sizeclustercolC{k}(i,1) = length(clustertemp);
            firstC = tempC(locC(end)+1);
            lastC = tempC(end);
        end
    else
        clustertemp = tempC(locC(j-1)+1) : tempC(locC(j));
        tryfind = find(clustertemp == tempN(tempfind(1)));
        if ~isempty(tryfind)
            sizeclustercolC{k}(i,1) = length(clustertemp);
            firstC = tempC(locC(j-1)+1);
            lastC = tempC(locC(j));
        end
    end
    if ~isempty(tryfind)
        if firstN<firstC
            firstpoint = firstN;
        else
            firstpoint = firstC;
        end
        if lastN<lastC
            lastpoint = lastC;
        else
            lastpoint = lastN;
        end
        overlap{k}(i,1) = lastpoint - firstpoint + 1;
    end
end
end
end
end
else % il y a plusieurs clusters NuMA
for z=1:length(locN)+1
    if z==1
        diffcluster = clusterN(i,tempN(1):tempN(locN(z))) -
clusterC(i,tempN(1):tempN(locN(z)));
        firstN = tempN(1);
        lastN = tempN(locN(z));
    elseif z==length(locN)+1
        diffcluster = clusterN(i,tempN(locN(z-1)+1):tempN(end)) -
clusterC(i,tempN(locN(z-1)+1):tempN(end));
        firstN = tempN(locN(z-1)+1);
        lastN = tempN(end);
    else
        diffcluster = clusterN(i,tempN(locN(z-1)+1):tempN(locN(z))) -
clusterC(i,tempN(locN(z-1)+1):tempN(locN(z)));
        firstN = tempN(locN(z-1)+1);
        lastN = tempN(locN(z));
    end
end

ordiff=sort(diffcluster);

```

```

clusters
    if ordiff(1)==0 % il y a au moins un point dans les deux
        tempfind = find(diffcluster==0);

        tempX = find(diffcluster==0); % pour trouver si il y a plus d'un
cluster CLIP dans le cluster NuMa
        tempZ = diff(tempX);
        findcluster = find(tempZ>1);
        if ~isempty(findcluster) % il y a forcément plusieurs clusters CLIP
            for j=1: numel(locC)+1 % boucle à travers les clusters de CLIP
                if z==1 % pour premier cluster de NuMA
                    if j==1
                        clustertemp = tempC(1) : tempC(locC(j));
                        if clustertemp(1)>tempN(1) % on cherche le
ler point de tempN égal au 1er point de clustertemp
                            tryfind = find(clustertemp(1) ==
tempN(1):tempN(locN(z)));
                                else %
sinon on cherche le 1er point de clustertemp égal au 1er point de
tempN
                                    tryfind = find(clustertemp == tempN(1)); %
                                end
                                if ~isempty(tryfind)
                                    sizeclustercolmulC{k}(i,r) = length(clustertemp);
                                    firstC = tempC(1);
                                    lastC = tempC(locC(j));
                                end
                                elseif j==numel(locC)+1
                                    clustertemp = tempC(locC(end)+1) : tempC(end);
                                    if clustertemp(1)>tempN(1)
                                        tryfind = find(clustertemp(1) ==
tempN(1):tempN(locN(z)));
                                            else
                                                tryfind = find(clustertemp == tempN(1));
                                            end
                                            if ~isempty(tryfind)
                                                sizeclustercolmulC{k}(i,r) = length(clustertemp);
                                                firstC = tempC(locC(end)+1);
                                                lastC = tempC(end);
                                            end
                                        else
                                            clustertemp = tempC(locC(j-1)+1) : tempC(locC(j));
                                            if clustertemp(1)>tempN(1)
                                                tryfind = find(clustertemp(1) ==
tempN(1):tempN(locN(z)));
                                                    else
                                                        tryfind = find(clustertemp == tempN(1));
                                                    end
                                                    if ~isempty(tryfind)
                                                        sizeclustercolmulC{k}(i,r) = length(clustertemp);
                                                        firstC = tempC(locC(j-1));
                                                        lastC = tempC(locC(j));
                                                    end
                                                end
                                            else
                                                % pour les autres clusters de NuMA
                                                % on cherche ici si le premier point du cluster de CLIP est
bien dans celui de NuMA
                                                    if j==1
                                                        clustertemp = tempC(1) : tempC(locC(j));
                                                        if z==length(locN)+1 % si z est égal au
dernier point de LocN (dernier cluster)
                                                            if clustertemp(1)>tempN(locN(z-1)+1)
                                                                tryfind = find(clustertemp(1) ==
tempN(locN(z-1)+1):tempN(end));
                                                                    else
                                                                        tryfind = find(clustertemp ==
tempN(locN(z-1)+1));
                                                                    end
                                                                else
                                                                    if clustertemp(1)>tempN(locN(z-1)+1)
                                                                        tryfind = find(clustertemp(1) ==
tempN(locN(z-1):locN(z)));
                                                                            else

```

```

tempN(locN(z-1)+1));
                                tryfind = find(clustertemp ==
                                end
                                end
                                if ~isempty(tryfind)
                                    sizeclustercolmulC{k}(i,r) = length(clustertemp);
                                    firstC = tempC(1);
                                    lastC = tempC(locC(j));
                                end
                                elseif j==numel(locC)+1
                                    clustertemp = tempC(locC(end)+1) : tempC(end);
                                    if z==length(locN)+1
% si z est égal au dernier point de LocN (dernier cluster)
                                        if clustertemp(1)>tempN(locN(z-1)+1)
                                            tryfind = find(clustertemp(1) ==
tempN(locN(z-1)+1):tempN(end));
                                        else
                                            tryfind = find(clustertemp ==
tempN(locN(z-1)+1));
                                        end
                                else
                                    if clustertemp(1)>tempN(locN(z-1)+1)
                                        tryfind = find(clustertemp(1) ==
tempN(locN(z-1)+1:locN(z)));
                                    else
                                        tryfind = find(clustertemp ==
tempN(locN(z-1)+1));
                                    end
                                end
                                    if ~isempty(tryfind)
                                        sizeclustercolmulC{k}(i,r) = length(clustertemp);
                                        firstC = tempC(locC(end)+1);
                                        lastC = tempC(end);
                                    end
                                else
                                    clustertemp = tempC(locC(j-1)+1) : tempC(locC(j));
                                    if z==length(locN)+1 % si z est égal au
dernier point de LocN (dernier cluster)
                                        if clustertemp(1)>tempN(locN(z-1)+1)
                                            tryfind = find(clustertemp(1) ==
tempN(locN(z-1)+1):tempN(end));
                                        else
                                            tryfind = find(clustertemp ==
tempN(locN(z-1)+1));
                                        end
                                    else
                                        if clustertemp(1)>tempN(locN(z-1)+1)
                                            tryfind = find(clustertemp(1) ==
tempN(locN(z-1)+1:locN(z)));
                                        else
                                            tryfind = find(clustertemp ==
tempN(locN(z-1)+1));
                                        end
                                    end
                                    if ~isempty(tryfind)
                                        sizeclustercolmulC{k}(i,r) = length(clustertemp);
                                        firstC = tempC(locC(j-1)+1);
                                        lastC = tempC(locC(j));
                                    end
                                end
                                end
                                end
                                if ~isempty(tryfind)
                                    sizeclustercolmulC{k}(i,r) = length(tempfind);
                                    sizeclustercolmulC{k}(i,r) = length(clustertemp);
                                    sizeclustercolmulN{k}(i,r) = length(diffcluster);
                                    if firstN<firstC
                                        firstpoint = firstN;
                                    else
                                        firstpoint = firstC;
                                    end
                                    if lastN<lastC
                                        lastpoint = lastC;
                                    else
                                        lastpoint = lastN;
                                    end
                                end
end

```

```

        overlapmul{k}(i,r) = lastpoint - firstpoint + 1;
        r=r+1;
    end
end
elseif numel(locC)==0           %il n' y a qu'un cluster CLIP qui overlap
    avec le cluster NuMA
    sizeclustercol{k}(i,z) = length(tempfind);
    sizeclustercolN{k}(i,z) = length(diffcluster);
    if numel(locC)==0
        clustertemp = tempC;

        if z==1
            tryfind = find(clustertemp == tempN(tempfind(1)));
            if ~isempty(tryfind)
                sizeclustercolC{k}(i,z) = length(clustertemp);
                firstC = tempC(1);
                lastC = tempC(end);
            end
        else
            tryfind = find(clustertemp == tempN(locN(z-1)+tempfind(1)));
            if ~isempty(tryfind)
                sizeclustercolC{k}(i,z) = length(clustertemp);
                firstC = tempC(1);
                lastC = tempC(end);
            end
        end
    end

    if firstN<firstC
        firstpoint = firstN;
    else
        firstpoint = firstC;
    end
    if lastN<lastC
        lastpoint = lastC;
    else
        lastpoint = lastN;
    end
    overlap{k}(i,z) = lastpoint - firstpoint + 1;
else                               % il y a plusieurs clusters CLIP mais un
    seul qui overlap avec NuMA
    for j=1:numel(locC)+1
        if z==1                       % pour le premier cluster de NuMA
            if j==1
                clustertemp = tempC(1) : tempC(locC(j));
                tryfind = find(clustertemp == tempN(tempfind(1)));
                if ~isempty(tryfind)
                    sizeclustercolC{k}(i,z) = length(clustertemp);
                    firstC = tempC(1);
                    lastC = tempC(locC(j));
                end
            elseif j==numel(locC)+1
                clustertemp = tempC(locC(end)+1) : tempC(end);
                tryfind = find(clustertemp == tempN(tempfind(1)));
                if ~isempty(tryfind)
                    sizeclustercolC{k}(i,z) = length(clustertemp);
                    firstC = tempC(locC(end)+1);
                    lastC = tempC(end);
                end
            else
                clustertemp = tempC(locC(j-1)+1) : tempC(locC(j));
                tryfind = find(clustertemp == tempN(tempfind(1)));
                if ~isempty(tryfind)
                    sizeclustercolC{k}(i,z) = length(clustertemp);
                    firstC = tempC(locC(j-1));
                    lastC = tempC(locC(j));
                end
            end
        end
        else                               % pour les autres clusters de NuMA
            if j==1
                clustertemp = tempC(1) : tempC(locC(j));
                tryfind = find(clustertemp ==
tempN(locN(z-1)+tempfind(1)));
                if ~isempty(tryfind)

```



```

% cas ou il y a un cluster de NuMA pour plusieurs clusters de CLIP
tailleclustercolmul =size(sizeclustercolmul);
r=1;
for k=1:tailleclustercolmul(2)
    r=1;
    if ~isempty(sizeclustercolmul{k})
        taillesousclustercolmul = size(sizeclustercolmul{k});
        for m=1:taillesousclustercolmul(1)
            for p=1:taillesousclustercolmul(2)
                if sizeclustercolmul{k}(m,p)~=0
                    orgoneclumul(k,r) = sizeclustercolmul{k}(m,p) / overlapmul{k}(m,p) * 100;
                    orgmemclumul(k,r) = overlapmul{k}(m,p) / sizeplane{k}(m) * 100;
                    r=r+1;
                end
            end
        end
    end
end
end

% compilations des résultats sur la taille des clusters, leur nombre, nombre de cluster commun,
taille de la partie partagée,
% et si les clusters sont répartis ou concentrés le long de la membrane

% taille des clusters
% NuMA
k=1;
for i=1:length(sizeclusterN)
    if ~isempty(sizeclusterN{i})
        for j=1:length(sizeclusterN{i})
            if ~isempty(sizeclusterN{i}{j})
                sumclusterN(k:k+length(sizeclusterN{i}{j})-1) = sizeclusterN{i}{j};
                sumclusterabsN(k:k+length(sizeclusterabsN{i}{j})-1) = sizeclusterabsN{i}{j};
                k=k+length(sizeclusterN{i}{j});
            end
        end
    end
end
figure;
R = hist(sumclusterN,max(sumclusterN));
graph = R/length(sumclusterN) *100;
bar(graph);
axis([0 30 0 40])
title('taille clusters NuMA relative')
figure;
R = hist(sumclusterabsN,max(sumclusterabsN));
graph = R/length(sumclusterabsN) *100;
bar(graph);
axis([0 50 0 20])
title('taille clusters NuMA absolue')

% CLIP
k=1;
for i=1:length(sizeclusterC)
    if ~isempty(sizeclusterC{i})
        for j=1:length(sizeclusterC{i})
            if ~isempty(sizeclusterC{i}{j})
                sumclusterC(k:k+length(sizeclusterC{i}{j})-1) = sizeclusterC{i}{j};
                sumclusterabsC(k:k+length(sizeclusterabsC{i}{j})-1) = sizeclusterabsC{i}{j};
                k=k+length(sizeclusterC{i}{j});
            end
        end
    end
end
figure;
R = hist(sumclusterC,max(sumclusterC));
graph = R/length(sumclusterC) *100;
bar(graph);
axis([0 9 0 45])
title('taille clusters CLIP relative')

figure;
R = hist(sumclusterabsC,max(sumclusterabsC));
graph = R/length(sumclusterabsC) *100;
bar(graph);

```

```

axis([0 30 0 25])
title('taille clusters CLIP absolue')

% nombre de clusters par plan
% NuMA
k=1;
for i=1:length(nbclusterN)
    if ~isempty(nbclusterN{i})
        for j=1:length(nbclusterN{i})
            if ~isempty(nbclusterN{i}{j})
                sumnbclusterN(k:k+length(nbclusterN{i}{j})-1) = nbclusterN{i}{j};
                k=k+length(nbclusterN{i}{j});
            end
        end
    end
end
end
figure;
R = hist(sumnbclusterN,max(sumnbclusterN));
graph = R/length(sumnbclusterN) *100;
bar(graph);
axis([0 25 0 14])
title('nbr clusters NuMA')

% CLIP
k=1;
for i=1:length(nbclusterC)
    if ~isempty(nbclusterC{i})
        for j=1:length(nbclusterC{i})
            if ~isempty(nbclusterC{i}{j})
                sumnbclusterC(k:k+length(nbclusterC{i}{j})-1) = nbclusterC{i}{j};
                k=k+length(nbclusterC{i}{j});
            end
        end
    end
end
end
figure;
R = hist(sumnbclusterC,max(sumnbclusterC));
graph = R/length(sumnbclusterC) *100;
bar(graph);
axis([0 12 0 40])
title('nbr clusters CLIP')

% plot de l'organisation des clusters
% NuMA
sizeN = size(orgN);
figure;
xlabel('percent of organised versus total size for all clusters')
ylabel('percent of total organised versus total size for all cluster')
hold on
for k=1:sizeN(1)
    if ~isempty(orgN(k,1))
        plot(orgN(k,:),orgcluN(k,),'go')
    end
end
end

%CLIP
sizeC = size(orgC);
for k=1:sizeC(1)
    if ~isempty(orgC(k,1))
        plot(orgC(k,:),orgcluC(k,),'ro')
    end
end
end
title('organisation pour tous les clusters de NuMA(green) et CLIP(red)')
%legend('NuMA','CLIP')

% plot de l'organisation des clusters co organisés NuMA et CLIP pour le cas ou il y a un pour un
sizemem = size(orgoneclu);
figure;
xlabel('percent of organised versus total size of cluster for all clusters')
ylabel('percent of total organised versus total size for all cluster')
hold on
for k=1:sizemem(1)
    if ~isempty(orgoneclu(k,1))
        plot(orgoneclu(k,:),orgmemclu(k,),'go')
    end
end

```

```

    end
end
axis([0 100 0 20])
title('organisation pour les clusters ou il y a co-organisation,1 NuMA et 1 CLIP')

%plot en bar de la taille de la coorganisation sur la taille du cluster
%dans le cas simple
figure;
xlabel('percent of organised versus total size of cluster for all clusters')
ylabel('percent in population')
abarc = histc(orgoneclusim,0:10:100);
abarc(end-1)=abarc(end-1) + abarc(end);
abarc(end)=[];
abarc = (abarc/sum(abarc)) * 100;
bar(abarc);
set(gca,'xtick',1:1:10)
set(gca,'xticklabel',10:10:100)
title('organisation pour les clusters ou il y a co-organisation,1 NuMA et 1 CLIP')
axis([0 11 0 20])

% plot de l'organisation des clusters co organisés NuMA et CLIP pour le cas ou il y a un pour deux
ou plus
sizemem = size(orgoneclumul);
figure;
xlabel('percent of organised versus total size of cluster for all clusters')
ylabel('percent of total organised versus total size for all cluster')
hold on
for k=1:sizemem(1)
    if ~isempty(orgoneclumul(k,1))
        plot(orgoneclumul(k,:),orgmemclumul(k,:), 'go')
    end
end
axis([0 100 0 50])
title('organisation pour les clusters ou il y a co-organisation,1 NuMA et 2 ou plus CLIP')

% plot de l'overlap entre les deux signaux en fonction de la taille totale
% du cluster
% attention a l'inversion de sens entre overlap et sizeclustercol ici

k=1;
figure;
hold on;
for i=1:length(overlap)
    if ~isempty(overlap{i})
        for j=1: numel(overlap{i})
            if overlap{i}(j)~=0
                plot((sizeclustercol{i}(j)/overlap{i}(j))*100,overlap{i}(j), 'ko');
                ratiooverlap(k)=(sizeclustercol{i}(j)/overlap{i}(j))*100;
                k=k+1;
            end
        end
    end
end
end

figure;
clusoverlap = histc(ratiooverlap,0:10:100);
clusoverlap = (clusoverlap / sum(clusoverlap)) * 100;
bar(clusoverlap);

figure;
for i=1:100
    for j=1:100
        red(i,j)=j/100;
        green(i,j)=i/100;
    end
end
blue=zeros(100,100);
catgreenred = cat(3,red,green,blue);
image(catgreenred)

Directory = 'G:\Boulot\Analysis\Analysis_Loc\Results\';
eval(['cd ',Directory]);
%save orgoneclusim_ orgoneclusim -ASCII -TABS
%save clusterabsN_ sumclusterabsN -ASCII -TABS
%save clusterabsC_ sumclusterabsC -ASCII -TABS

```

## Programme Calcul d'angle dans la crypte

```
function concatenate

%directory='F:\Confocal_SP5\Analysis';
directory='G:\Boulot\Analysis\AnalyseGlobale\RawFilesPerSession\';
eval(['cd ',directory]);
%files = dir;
Name_Session = {'Session061120_bis';'Session070723_bis';'Session070725_bis'};
for i=1:length(Name_Session); %i = 13:20
    %direc = files(i).name;
    eval(['cd ',[directory,'\ ',Name_Session{i}]]);%    eval(['cd ',[directory,'\ ',direc]]);
    filenames = dir;
    m=-2;
    n=1;
    for j = 1:length(filenames)
        disp(filenames(j))
        shortname = ['Crypte', sprintf('%02d',j), '_Axe.csv'];
        short = length(shortname);

        if exist(shortname)==2
            disp(shortname)
            mitosisname = ['Crypte', sprintf('%02d',j), '_Mitosis.csv'];
            filetemp = textread(shortname,'%s','delimiter',';');
            k=1;
            for p=1:length(filetemp)
                temp=filetemp{p};
                if ~isempty(str2num(temp))
                    if str2num(temp)==1 | str2num(temp)==2
                        else
                            num(k)=str2num(temp);
                            k = k+1;
                        end
                    end
                end
            end
            sizenum = size(num);
            if sizenum(1)<sizenum(2)
                num = num';
            end
            num=num(2:end);

            n=1;
            m=m+3;
            resultname{m,n} = shortname(7:short-4);
            result(m:m+2,n) = num([2 4 6]);
            result(m:m+2,n+1) = num([3 5 7]);
            clear num

            if exist(mitosisname)==2

                filetemp = textread(mitosisname,'%s','delimiter',';');
                k=1;
                for p=1:length(filetemp)
                    temp=filetemp{p};
                    if ~isempty(str2num(temp))
                        if str2num(temp)==1 | str2num(temp)==2
                            else
                                num(k)=str2num(temp);
                                k = k+1;
                            end
                        end
                    end
                end
                sizenum = size(num);
                if sizenum(1)<sizenum(2)
                    num = num';
                end
                num=num(2:end);

                resultname{m,n+2} = mitosisname(7:long-2);
                result(m:m+2,n+2) = num([2 4 6]);
                result(m:m+2,n+3) = num([3 5 7]);
                n=n+2;
            else
                disp('error reading file')
            end
        end
    end
end
```

```

else
    for t = 1:40
        longname = ['Crypte', sprintf('%02d',j), '_Axe', sprintf('%02d',t), '.csv'];
        long = length(longname);

        if exist(longname)==2
            disp(longname)
            mitosisname = ['Crypte', sprintf('%02d',j), '_Mitosis', sprintf('%02d',t), '.csv'];
            filetemp = textread(longname, '%s', 'delimiter', ';');
            k=1;
            for p=1:length(filetemp)
                temp=filetemp{p};
                if ~isempty(str2num(temp))
                    if str2num(temp)==1 | str2num(temp)==2
                        else
                            num(k)=str2num(temp);
                            k = k+1;
                        end
                    end
                end
            end
            sizenum = size(num);
            if sizenum(1)<sizenum(2)
                num = num';
            end
            num=num(2:end);
            n=1;
            m=m+3;
            resultname{m,n} = longname(7:long-4);
            result(m:m+2,n) = num([2 4 6]);
            result(m:m+2,n+1) = num([3 5 7]);
            clear num

            if exist(mitosisname)==2

                filetemp = textread(mitosisname, '%s', 'delimiter', ';');
                k=1;
                for p=1:length(filetemp)
                    temp=filetemp{p};
                    if ~isempty(str2num(temp))
                        if str2num(temp)==1 | str2num(temp)==2
                            else
                                num(k)=str2num(temp);
                                k = k+1;
                            end
                        end
                    end
                end
                sizenum = size(num);
                if sizenum(1)<sizenum(2)
                    num = num';
                end
                num=num(2:end);

                resultname{m,n+2} = mitosisname(7:long);
                result(m:m+2,n+2) = num([2 4 6]);
                result(m:m+2,n+3) = num([3 5 7]);
                n=n+2;
            else
                disp('error reading file')
            end
        end
        clear num
    end
end
end
if ~isempty(result)
    save([Name_Session{i}], 'result')
end
if ~isempty(resultname)
    save([Name_Session{i}], '_name', 'resultname')
end
result=[];
resultname=[];
end

```

```

function cryptcalculus

directory='G:\Boulot\Analysis\AnalyseGlobale\Analysis\';
eval(['cd ',directory]);
data=load('result_1638N');
data=data.result;
s=size(data);
global angle
global angleclass
% use the function transform for the calculus of angle
nbrcrypt = length(data(:,1))/3;
p=1;
for i=1:3:length(data(:,1))
    noto = find(data(i,:)~=0);
    nbrmitosis = length(noto)/2 -1;
    point=data(i:i+2,1:2);
    point=point';
    k=3;
    for j=1:nbrmitosis
        temppoint=data(i:i+2,k:k+1);
        point(3:4,1:3)=temppoint';
        [alpha,beta,gamma]=Transform(point);
        angle(i,j)=alpha;
        angle(i+1,j)=beta;
        angle(i+2,j)=gamma;
        angleclass(p,1)=alpha;
        angleclass(p,2)=beta;
        angleclass(p,3)=gamma;
        k=k+2;
        p=p+1;
    end
end

save angle_1638N angle
save angleclass_1638N angleclass

```

```

function [anglealpha,anglebeta,anglegamma,c]=transform(point)

% calculus without rotation, using only vectors X,Y,Z Y beeing defined as the vector going from
% midle of the spindle toward crypt
% axis
%point contains XYZ coordinates organized as follow : point(1,:)=X,Y,Z coordinates of point1 of the
crypt long axis,
% point(2,:)=X,Y,Z coordinates of point2 of the
crypt long axis,
% point(3,:)=X,Y,Z coordinates of point1 of the
spindle,
% point(4,:)=X,Y,Z coordinates of point2 of the
spindle

%angle alpha, with x axis (long axis of the crypt)
v1 = point(2,:)-point(1,:);
v1 =v1/norm(v1);
v2 = point(4,:)-point(3,:);
v2 =v2/norm(v2);
anglealpha = acos(dot(v1,v2));
anglealpha = anglealpha*180/pi;
if anglealpha>90
    anglealpha = 180 -anglealpha;
end

% angle beta, with y axis, going from midle of the spindle (point x0) toward long axis of the crypt,
the projection of x0 on the
% long axis

mpoint = (point(3,:) + point(4,:))/2;
x1 = point(1,1);
y1 = point(1,2);
z1 = point(1,3);

x2 = point(2,1);
y2 = point(2,2);
z2 = point(2,3);

```

```

x0 = mpoint(1,1);
y0 = mpoint(1,2);
z0 = mpoint(1,3);

%c = (x1*(x0 - x1) + y1*(y0 - y1) + z1*(z0 - z1)) / (x1*(x2 - x1) + y1*(y2 - y1) + z1*(z2 - z1));
c = ((x0 - x1)*(x2 - x1) + (y0 - y1)*(y2 - y1) + (z0 - z1)*(z2 - z1)) / ((x2 - x1)^2 + (y2 - y1)^2 +
(z2 - z1)^2);
mpoint(2,1) = x1 + c*(x2 - x1);
mpoint(2,2) = y1 + c*(y2 - y1);
mpoint(2,3) = z1 + c*(z2 - z1);

v1 = point(4,:) - point(3,:);
v1 = v1/norm(v1);
v2 = mpoint(2,:) - mpoint(1,:);
v2 = v2/norm(v2);
anglebeta = acos(dot(v1,v2));
anglebeta = anglebeta*180/pi;
if anglebeta>90
    anglebeta = 180 - anglebeta;
end
% mise par rapport à l'horizontal pour simplifier, ainsi 90° avant devient
% 0°
anglebeta = 90 - anglebeta;

% angle gamma, with the axis normal to x & y axis defined before

v1 = point(2,:) - point(1,:);
v1 = v1/norm(v1);
v2 = cross(v1,v2);
v2 = v2/norm(v2);
v1 = point(4,:) - point(3,:);
v1 = v1/norm(v1);
anglegamma = acos(dot(v1,v2));
anglegamma = anglegamma*180/pi;
if anglegamma>90
    anglegamma = 180 - anglegamma;
end

function [resultangle,result,X,Y] = plotanglecrypt

% plot frequence cumulée
% utilise variable angleclassfinal -> angle
%          resultfreqangle -> angleclass

directory='G:\Boulot\Analysis\AnalyseGlobale\Analysis';
eval(['cd ',directory]);
angle = load('angleclassfinal.mat');
angle = angle.angleclassfinal;
angleclass = load('resultfreqanglefinal.mat');
angleclass = angleclass.resultfreqanglefinal;

style=['b','g','r','c','m','r','k'];
angletype={'alpha','beta','gamma'};
name={'WT','Delta14','1638N','Mincolon','Mingrele','ACFdelta14','APCrelox'};

low=0:5:85;

% figure combinée, pour alpha et beta uniquement
angletype={'alpha','beta','gamma'};
for i=1:2
    maxZ = max(angleclass(:,i,:));
    maxZ = max(maxZ);
    for j=1:7
        temp(:,j) = angleclass(:,i,j);
    end

    figure,
    for j=1:7
        subplot(3,3,j),
        bar(angleclass(:,i,j),style(j));
    end
end

```

```

        %xlabel('angle en °');
        ylabel('pourcentage de la population');
        set(gca,'Xtick',2:2:18);
        set(gca,'Xticklabel',10:10:90);
        axis([0 19 0 maxZ]);
        %title(['angle ',angletype{i},name{i}]);
    end
    figure
    %subplot(3,3,8),
    bar3(low,temp,0.4);
    axis([-0.5 8 0 90 0 maxZ]);
    ylabel('angle en °');
    zlabel('pourcentage de la population');
    legend('WT','Delta14','1638N','Mincolon','Mingrele','ACFdelta14','APCcrelox');
end
% figure simple, pour alpha et beta uniquement
angletype={'alpha','beta','gamma'};
for i=1:2
    maxZ = max(angleclass(:,i,:));
    maxZ = max(maxZ);
    for j=1:7
        temp(:,j) = angleclass(:,i,j);
    end

    % figure,
    for j=[1,6,7]
        figure;
        %subplot(3,3,j),
        bar(angleclass(:,i,j),style(j));
        % xlabel('angle en °');
        % ylabel('pourcentage de la population');
        % set(gca,'Xtick',2:2:18);
        % set(gca,'Xticklabel',10:10:90);
        set(gca,'Xticklabel','');
        set(gca,'Yticklabel','');
        axis([0 19 0 maxZ]);
        %title(['angle ',angletype{i},name{i}]);
    end

    figure,
    %subplot(3,3,8),
    bar3(low,temp,0.4);
    axis([-0.5 8 0 90 0 maxZ]);
    ylabel('angle en °');
    zlabel('pourcentage de la population');
    %legend('Mingrele');
%legend('WT','Delta14','1638N','Mincolon','Mingrele','ACFdelta14','APCcrelox');
end

%freq cumulée par angle pour les 3 types de souris
for i=1:2
    figure,hold on
    for j=[1,6,7]
        index=find(angle(:,i,j)~=0);
        popu=sort(angle(index,i,j));
        plotaxey = 1:length(index);
        plotaxey = plotaxey / length(index) * 100;
        x(j) = plot(popu,plotaxey,style(j));
        plot(popu,plotaxey,[style(j),''],'linewidth',5);
        %plot(popu,plotaxey,[style(j),'o']);
    end
    % xlabel('angle in °');
    % ylabel('percent in population');
    set(gca,'Xticklabel','');
    set(gca,'Yticklabel','');
    axis([0 90 0 100])
    % title(angletype{i});
    %legend(x,'WT','Delta14','1638N','Mincolon','Mingrele');
%legend(x,'WT','Delta14','1638N','Mincolon','Mingrele','ACFdelta14','APCcrelox');
end

directory='G:\Boulot\Paper\Cryptes\Images\Figure_3\';
eval(['cd ',directory]);

```

## Logiciels Utilisés

Différents programmes ont été nécessaires à la réalisation de cette thèse, qui peuvent se regrouper en logiciels spécifiques au traitement de données d'imagerie, traitement de données mathématiques, outils bibliographiques, gestion de documents et projets, outils graphiques, , traitement graphique et écriture de manuscrit. Dans la mesure du possible j'ai utilisé des logiciels gratuits. La plupart de ces logiciels sont en plus libres, c'est-à-dire que le code source est disponible et modifiable.

### Traitement de données d'imagerie

#### – ImageJ

ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) est un logiciel gratuit, sous license libre, fonctionnant sous Java, disposant d'une large communauté très active dans le développement de plug-ins. Ce logiciel est facile d'utilisation, dispose de nombreuses fonctionnalités de bases qui peuvent être étendues par l'ajout de plugins. Il est possible de programmer des scripts dans un format texte, le langage utilisé est simple et efficace pour réaliser des routines qui permettent d'effectuer des opérations en masse, comme appliquer un filtre à l'ensemble des images présentes dans plusieurs répertoires. Ce logiciel a été utilisé pour visualiser les données des time-lapses réalisés sur les MDCK et SW480, compter les durées des stades mitotiques, appliquer un filtre aux acquisitions des time-lapses. Le point faible d'ImageJ est le traitement de données 3D, dont la visualisation est encore peu performante. A noter que plusieurs plugins existent, parmi lequel ImageJ 3D viewer (<http://132.187.25.13/home/?category=Download&page=Viewer3D>) qui propose des fonctions intéressantes.

#### – Imaris

Imaris (<http://www.bitplane.com/>) est un logiciel payant édité par BitPlane. Imaris fait référence dans le domaine de traitement de données d'imagerie 3D avec les logiciels Volocity (<http://www.improvision.com/products/voloccity/>) et Amira (<http://www.amiravis.com/>). Les fonctionnalités incluent la représentation en volume, en iso-surface, la possibilité de placer des points de mesure dans l'espace tridimensionnel, la visualisation avec des plans orthornormaux et librement orientés, la possibilité de réaliser des animations complexes, où l'utilisateur peut en temps réel manipuler les données pendant l'enregistrement de la vidéo. Ce logiciel a été utilisé pour placer en 3D les points de repères dans les acquisitions de cryptes qui ont servis aux calculs des angles  $\alpha$  et  $\beta$ . Imaris a également été utilisé pour l'extraction des coordonnées des kinétochores pour le calcul des distances et angles avec l'axe du fuseau dans les cellules SW480. Ce logiciel s'est révélé entre autre indispensable à la visualisation des acquisitions sur les cryptes, en particulier pour l'analyse du devenir du pied basal au cours de la mitose.

#### – Amira

Amira (<http://www.amiravis.com/>) est un logiciel de visualisation de données d'images, également utilisé dans le domaine médicale pour la visualisation de donnée IRM. Une des particularité d'Amira est la disponibilité d'outils de segmentation, qui permettent de délimiter différentes régions sur les plans individuels d'une acquisition et de représenter en volume ces différentes régions. Cet outil a été utilisé pour créer la visualisation des cellules en division dans la niche page 134.

#### – Metamorph

Metamorph (<http://www.moleculardevices.com/pages/software/metamorph.html>) est un logiciel pouvant contrôler un microscope pour l'acquisition et réaliser la visualisation de données d'imagerie. Ce logiciel très complet propose de puissants outils de réglages et de visualisations. Metamorph a été utilisé uniquement pour la visualisation. Il est possible de programmer des macros utilisant les outils de visualisations. Metamorph a été utilisé pour réaliser l'extraction des coordonnées des contours des cellules des acquisitions time-lapse sur les MDCK et SW480.

## Traitement de données

#### – MATLAB

MATLAB (<http://www.mathworks.com/>) est un logiciel payant de traitement de données numériques. Une des principales caractéristique de MATLAB est de fonctionner sur la base du calcul matriciel. Autrement dit les données sont traitées sous la forme de matrice, et la plupart des opérations disponibles sont prévues pour fonctionner sur des matrices. L'intérêt de MATLAB réside dans plusieurs points : d'une part de nombreuses fonctions sont disponibles, le langage pour l'écriture de scripts est simple et extrêmement efficace car concis, et enfin il existe de nombreuses fonctions de visualisation. MATLAB est en revanche peut adapté au traitement de chaines de caractères. Il convient de signaler trois alternatives à MATLAB, aucune ne pouvant remplacer directement celui-ci mais chacune pouvant se révéler complémentaire. Les deux premiers sont Scilab (<http://www.scilab.org/>) et Octave (<http://www.gnu.org/software/octave/>). Ces deux logiciels proposent de nombreuses fonctions équivalentes à MATLAB, des outils de visualisations graphiques et des plugins dans le cas de Scilab. Ces deux logiciels sont développés par une communauté active et font l'objet de mises à jour régulières. Une autre alternative est l'utilisation du langage Python (<http://www.python.org/>) avec des modules développé spécifiquement pour les scientifiques tels python(x,y) ([http://www.pythonxy.com/foreword\\_fr.php](http://www.pythonxy.com/foreword_fr.php)) ou SciPy (<http://www.scipy.org/>) utilisant le module NumPy (<http://numpy.scipy.org/>). Le langage Python n'est pas à la base un langage orienté mathématique, mais il gagne depuis plusieurs années en popularité,

grâce entre autre à la rigueur de sa programmation et la possibilité d'intégrer d'autres langages dans des scripts. Il est possible d'utiliser l'environnement de développement Eclipse (<http://www.eclipse.org/>), très puissant pour gérer des projets multi-scripts.

– **Ggobi**

Ggobi (<http://www.ggobi.org/>) est un logiciel gratuit de visualisation de données. Celles-ci doivent être au format HTML. Ggobi propose de nombreuses façons de visualiser des données, par l'utilisation de différents types de graphiques. Une fois les données ouvertes il est très aisé de tester différentes représentations, qui peuvent être très utiles dans l'exploration de données multi-paramétriques. Il est possible de communiquer facilement entre Ggobi et R.

– **R**

R (<http://www.r-project.org/>) est un logiciel gratuit de traitement de données mathématiques. Il s'agit d'un logiciel de référence dans le traitement statistique de données. R autorise l'écriture de scripts. Ce logiciel a été utilisé pour tous les calculs statistiques réalisés au cours de ce travail de thèse, en particulier pour les données figurant dans l'article. R dispose entre autre d'outils de visualisations de données puissants.

## Outils bibliographiques

– **JabRef**

JabRef (<http://jabref.sourceforge.net/>) est un logiciel gratuit de gestion de références bibliographiques. Ce logiciel propose une connexion directe à PubMed pour rapatrier les références et autorise l'import de références depuis EndNote. Il est possible d'organiser les références par dossiers, une même référence pouvant figurer dans plusieurs dossiers. Il est possible de lier les références aux fichiers PDFs des articles. Enfin ce logiciel formate la bibliographie en .bib, format utilisé par  $\text{\LaTeX}$  pour les références. Ce logiciel a été utilisé pendant la rédaction pour servir d'interface entre ma bibliographie sous EndNote et  $\text{\LaTeX}$  utilisé pour la rédaction du manuscrit.

– **Zotero**

Zotero (<http://www.zotero.org/>) est un plug-in pour Firefox qui permet de gérer une base de références bibliographiques directement depuis le navigateur internet. L'intérêt majeur est de pouvoir directement enregistrer des références depuis de nombreux sites web, y compris PubMed. Il est possible de lier les références aux fichiers PDFs, de mettre des tags et d'organiser les références par dossier. Des plugs-in sont disponibles qui permettent d'interfacer la librairie Zotero avec OpenOffice ou Word.

## Gestion de documents, projets

### – Freemind

Freemind ([http://freemind.sourceforge.net/wiki/index.php/Main\\_Page](http://freemind.sourceforge.net/wiki/index.php/Main_Page)) est un logiciel libre et gratuit fonctionnant sous Java. Il fonctionne sur la base des cartes heuristiques ou cartes mentales, c'est-à-dire une représentation graphique d'idées reliées entre elles par des liens. Il est possible de créer des liens entre les idées, soit graphiquement soit par l'intermédiaire d'un lien cliquable. Une idée est représentée par un texte, qui peut être édité en HTML, l'idée peut contenir une image, et de nombreuses icônes sont disponibles. La puissance de Freemind est la capacité d'organiser spatialement ces idées, et de créer des arborescences dépliées qui rendent la navigation aisée.

### – PersonalBrain

PersonalBrain (<http://www.thebrain.com/>) est un logiciel propriétaire payant de gestion de projet. Son interface graphique permet la création d'idées, de lier ces idées à des fichiers. La puissance de PersonalBrain réside dans la possibilité de lier n'importe quelle idée à autant d'idées que voulu, ce qui abolit la structure en arborescence traditionnelle de l'explorateur windows par exemple. Ainsi une idée peut être liée par un lien de type supérieur à 10 autres et être elle-même le niveau supérieur de 10 autres idées. Ceci permet la création de réseaux complexes mais fonctionnels grâce à l'interface graphique performante. Ce logiciel est particulièrement bien adapté à la gestion bibliographique, en effet le dilemme classique dans la gestion bibliographique concerne le classement des articles par sujet. Comme un même élément peut être relié à un nombre infini de parents, PersonalBrain permet de classer les articles selon autant de thématiques que désiré.

## Outils Graphiques

### – Gimp

Gimp (<http://www.gimp.org/>) est un logiciel gratuit de traitement d'images. Il est possible d'ajouter des plugs-in. Très puissant, son utilisation n'est pas forcément intuitive, il permet néanmoins de réaliser les opérations de base facilement. Les images pour l'article ont été éditées avec Gimp.

### – Inkscape

Inkscape (<http://www.inkscape.org/?lang=fr>) est un fantastique logiciel libre et gratuit de dessin vectoriel. Très simple à prendre en main, il n'en reste pas moins très puissant et propose de nombreuses fonctionnalités. Il s'agit d'un logiciel de dessin au format SVG, qui supporte la gestion de calques, de nombreux effets de filtres, de modifications de tracés et autres. Les figures de l'article ont été réalisées sous Inkscape, et toutes les figures modifiées ou créés dans le manuscrit ont été réalisées sous Inkscape.

### – Blender

Blender (<http://www.blender.org/>) est un logiciel gratuit de production de scènes 3D et d'animation. Blender est hallucinant, les possibilités sont infinies et la maîtrise complète d'un tel logiciel semble impossible. Il est cependant possible d'utiliser Blender à des fins modestes, et il se révèle assez facile d'apprentissage. Blender a été utilisé pour réaliser la figure 3D de l'article. Il permet la création de formes, avec gestion des textures et formes, positionnement de la caméra, réglage des lumières ....

## Rédaction du manuscrit

### – L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X

L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X (<http://www.latex-project.org/>) est un logiciel gratuit de création de documents typographiques. L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X possède de nombreux avantages par rapport à Word, outre son prix, parmi lesquels la rigueur des documents produits, sa stabilité, la possibilité de régler très précisément tous les détails de la mise en page, la typographie très soignée, les référencements bibliographiques, les références internes au document, la création aisée de table des matières, table des figures, glossaire, etc... L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X nécessite un investissement mais celui-ci se retrouve payant par la qualité du document produit et l'absence de crise de dernière minute à cause d'un problème de mise en page ... L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X gère évidemment la création de document PDFs avec création des liens vers les différentes parties du document. Inutile de préciser que ce manuscrit a été écrit sous L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X ;) J'ai utilisé MikTeX (<http://miktex.org/>) comme implémentation de T<sub>E</sub>X et T<sub>E</sub>XnicCenter (<http://www.texniccenter.org/>) comme interface pour la rédaction.

# Glossaire

## A

<b>AAPC</b>	Attenuated Adenomatous Polyposis Coli
<b>ACF</b>	Aberrant Crypt Foci
<b>ADN</b>	Acide DesoxyriboNucléique
<b>AGS3</b>	Activator of G-protein Signaling 3
<b>AIP</b>	Anterior Intestinal Portal
<b>AOM</b>	Azoxymethane
<b>APC</b>	Adenomatous Polyposis Coli
<b>ARN</b>	Acide RiboNucléique

## B

<b>Baz</b>	Bazooka
<b>BCAC</b>	Beta Catenin Accumulated Crypt
<b>BMP</b>	Bone Morphogenic Protein
<b>BrdU</b>	Bromodeoxyuridine

## C

<b>Cad</b>	Cadherin
<b>CC-IC</b>	Colon Cancer Initiating Cell
<b>CHO</b>	Chinese Hamster Ovary
<b>CIN</b>	Chromosome Instability
<b>CIP</b>	Caudal Intestinal Portal
<b>CK1<math>\alpha</math></b>	Casein Kinase 1 $\alpha$
<b>CLIP</b>	Cytoplasmic Linker Protein
<b>CLASP</b>	CLIP-Associated Protein
<b>C<sub>ter</sub></b>	C terminal

## D

<b>DBZ</b>	Dibenzazepine
<b>Dgo</b>	Diego
<b>Dkk1</b>	Dickkopf1
<b>Dlg</b>	Disc Large
<b>Ds</b>	Dachsous
<b>Dsh</b>	Dishevelled
<b>dsRNA</b>	Double-Strand RiboNucleic Acid
<b>DSS</b>	Dextran Sodium Sulfate

## E

<b>EB1</b>	microtubule End Binding protein 1
<b>ENU</b>	Ethyl Nitroso Urée

**F**

**FAP** Familial Adenomatous Polyposis  
**Fz** Frizzled

**G**

**GAP** GTPase-Activating Protein  
**GC** Ganglial Cell  
**GDI** Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor  
**GDP** Guanosine DiPhosphate  
**GEF** Guanine nucleotide Exchange Factor  
**GFP** Green Fluorescent Protein  
**GMC** Ganglion Mother Cell  
**GoLoco** G<sub>αi/o</sub>-Loco "interaction motif"  
**GPCR** G-Protein Coupled Receptor  
**GPR** G-Protein Regulator  
**GSK3β** Glycogen Synthase Kinase 3 β  
**GTP** Guanosine TriPhosphate  
**GTPase** Guanosine TriPhosphatase

**H**

**<sup>3</sup>HTdR** Thymidine Tritiée  
**HA** Hyaluronane  
**HeLa** Henrietta Lacks  
**HES** Hairy/Enhancer of Split  
**hNPC** human Neural Precursor Cell

**K**

**Khc-73** Kinesin heavy chain 73

**L**

**LEF** Lymphoid Enhancer-binding Factor  
**Lis1** Lissencephaly 1  
**LGN** Leucine-Glycine-Asparagine  
**LOH** Loss Of Heterozygosity  
**LRC** Label Retaining Cell  
**LRP** Lipoprotein Receptor-related Protein

**M**

**MACF** Microtubule Actin Cross-linking Factor  
**MAP** Microtubule Associated Protein  
**MCAK** Mitotic Centromere-Associated Kinesin  
**MDCK** Madin Darbin Canine Kidney  
**Min** Multiple Intestinal Neoplasia  
**MOH** Maintenance Of Heterozygosity  
**MTOC** Microtubule-Organizing Center

**N**

<b>NEB</b>	Nuclear Envelop Breakdown
<b>NES</b>	Nuclear Export signal
<b>NHBE</b>	Normal Human Bronchial Epithelial
<b>NICD</b>	Notch Intracellular Domain
<b>NLS</b>	Nuclear Localisation signal
<b>NRK</b>	
<b>N<sub>ter</sub></b>	N terminal
<b>NuMA</b>	Nucleus Mitotic Apparatus

**O**

<b>OCD</b>	Oriented Cell Division
------------	------------------------

**P**

<b>PAR</b>	Partionning Defective
<b>PCP</b>	Planar Cell Polarity
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol 3 kinase
<b>PINS</b>	Partner of Inscuteable
<b>PIP3</b>	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
<b>PIRC</b>	Polyposis In the Rat Colon
<b>Pk</b>	Prikkle
<b>PKC</b>	Protein Kinase C
<b>PKD</b>	Polycystic Kidney Disease
<b>Pon</b>	Partner of Numb

**R**

<b>RGS</b>	Regulator of G protein Signalling
<b>Ric</b>	Resistant to Inhibitors of Cholinesterase

**S**

<b>SAC</b>	Spindle Assembly Checkpoint
<b>SAMP</b>	Ser-Arg-Met-Pro
<b>Sec</b>	Seconde
<b>SOP</b>	Sensory Organ Precursor
<b>SPB</b>	Spindle Pole Body
<b>Stbm</b>	Strabismus

**V**

<b>Vg</b>	VangGogh
-----------	----------

**T**

**TCF** T cell transcription factor  
**+Tips** plus end Tracking Proteins  
**TGF** T Growth Factor  
**TPR** Tetratrico Peptide Repeat  
**TTL** Tubuline Tyrosine Ligase

**X**

**XMAP215** Xenopus Microtubule Associated Protein 215

**W**

**Wnt** Wingless  
**Wt** Wild Type

# Index

- $\Delta 14$ 
  - souris  $\Delta 14$ , 81, 83, 85
- $\beta$ -caténine, 44, 45, 50, 51, 67–70, 80, 81, 138, 143, 145
- $\gamma$ -sécrétase, 66, 67
- $^3\text{HTdR}$ , 75
- 1638N
  - souris 1638N, 81, 83, 85
- 1638T
  - souris 1638T, 47, 83, 144
- AAPC, 83, 85
- ACF, 77
  - Min*, 84, 85
  - BCAC, 81
  - dysplasique, 80, 81, 84
  - néoplasique, 80
  - non dysplasiques, 78, 79, 85
- Actine, 46, 49, 52–55, 141
- Adénome, 67, 73, 78, 79, 81, 86
- AIP, 62
- Anoïkis, 61
- AOM, 78, 80, 84, 85
- APC, 8, 11, 17, 20, 35, 44–51, 54, 55, 59, 68–70, 73, 74, 77, 79, 81–83, 86, 137–139, 141, 142, 144–146
  - APC1, 50, 51
  - APC2, 50, 51
- APC2, 50
- aPKC, 19, 20, 22
- Apoptose, 61, 65, 72, 73, 75
- Armadillo, 45, 46, 51
- ASEF, 45
- Axine, 44, 45, 68–70, 138, 145
- Bazooka, 15, 17, 19, 20, 22, 36, 51
- Bik1p, 42
- Bim1p, 41–43
- BMP, 63, 66, 67
- Brat, 19
- BrdU, 71, 75, 76
- Bub, 48
  - Bub1, 144
  - BubR1, 48, 144
- Caenorhabditis elegans, 2, 4, 11, 12, 17, 19, 22–24, 26, 29, 32, 34, 36, 39, 40, 42, 140, 141, 146
- CD-44, 56
- Cdx1, 71
- Cdx2, 71
- Cellule
  - Caliciforme, 60, 61, 67, 80
  - CHO, 27
  - de Paneth, 60, 61, 68–71
  - Enteroendocrine, 60, 61, 68
  - HeLa, 52, 55
  - MDCK, 8, 25, 27, 42, 46, 49, 56, 62, 140
  - NHBE, 56
  - NRK, 25
  - SW480, 47, 50, 137–139
  - SW480-APC, 137, 138, 145
- Centrosome, 8, 10, 12, 15, 20, 21, 35, 37, 39, 41, 46, 47, 49, 51, 138, 142, 145, 146
- Cil primaire, 65
- CIP, 62
- CK1 $\alpha$ , 68, 69
- CLASP, 11
- CLIP-115, 11
- CLIP-170, 11, 42, 140, 141
- Conductine, 45, 145
- Cortactine, 52, 53
- Dachsous, 3, 4, 142
- DaPKC, 19
- Delta, 66
- Dextran Sulfate Sodium (DSS), 84
- Diego, 3
- Dishevelled, 3, 19, 57, 68, 142, 143
- Dkk-1, 69
- Dlg, 20, 34, 35, 44–46, 49, 50, 137, 138, 146
- Dlkb1, 22

DmPAR-6, 19, 20  
 Drosophila melanogaster, 2–4, 12, 14, 15, 17, 19, 22–24, 26, 30, 34, 38, 44, 50, 51, 55, 57, 68, 75, 142, 146  
 DSS, 84  
 Dynéine, 11, 14, 23, 25, 27, 28, 40–44, 140  
 Dynactine, 9, 41, 44, 140  
 DYRB-1, 40  
  
 E-cadhérine, 50, 137, 138  
 EB1, 11, 45, 47–50, 56, 84, 140  
 Ectoderme, 62  
 Endoderme, 62, 63  
 Endorphine, 61  
 ENU, 82, 84  
 EphB, 70  
 EphB2, 72  
 Ephrin-B, 70  
 ERM, 56  
 Ezrine, 52, 53  
  
 FAP, 70, 73, 77–79, 82, 83, 143  
 Fat, 3, 142, 143  
 Fission de la crypte, 76, 77, 81, 82  
 Frizzled, 3, 15, 19, 21, 36, 37, 57, 68  
  
 $G_{\alpha}$ , 13, 16, 23, 25, 29, 30, 32, 38  
      $G_{\alpha i}$ , 15–17, 20–23, 26–28, 30, 31, 34–40, 44  
      $G_{\alpha o}$ , 31  
     GOA-1, 29–32, 39, 141  
     GPA-16, 29–32, 39, 141  
 $G_{\beta}$ , 23, 24, 29, 32, 33  
 $G_{\gamma}$ , 23, 24, 32, 33  
 GAP, 24  
 GDI, 23, 25, 30, 33  
 GDP, 7, 23–25, 27–30, 32–35  
 GEF, 23, 25, 28, 30, 45  
 GMC, 15, 16, 18  
 Golgi  
     Golgi, appareil de, 41, 49  
 GoLoco, 25, 30, 34, 38  
 GPR-1/2, 13, 17, 29–33, 39, 40, 44  
 GSK3 $\beta$ , 44, 45, 49, 68, 69, 137, 138  
 GTP, 7, 10, 23, 24, 28, 29, 32, 33  
  
 Hedgehog, 66  
 Hyaluronane (HA), 56  
  
 Inscuteable, 16, 19, 26, 34, 35, 38, 51  
 Intestin, 5, 61–63, 69, 70, 76–78, 142  
     côlon, 60, 63, 71, 85  
     grêle, 60, 63, 67, 71, 83, 85  
 IQGAP1, 45, 140, 141  
  
 Jonctions  
     adhérentes, 5, 16, 20, 53, 137, 138  
     hémi-desmosomes, 5  
     serrées, 5, 6  
  
 K-ras, 66  
 Kap3, 45, 47  
 Kar9p, 41–43  
 Karyotype  
     acrocentrique, 86  
     métacentrique, 86  
 Khc-73, 34, 35, 146  
 Ki-ras, 59  
 KIF3A, 45, 47  
 KIF3B, 47  
 Kinétochore, 9, 10, 41, 44, 47, 48, 138, 139, 144  
 Kip2p, 42, 43  
  
 LEF, 69  
 LGN, 17, 23, 25–28, 30, 34  
 Lgr5, 72, 144  
 LIN-5, 13, 17, 33, 39, 40, 43, 44  
 Lis1, 11, 40, 42, 44, 140  
 LKB, 66  
 Lkb1, 22  
 Loss Of Heterozygosity (LOH), 84–86  
 LRP5, 68  
 LRP6, 68  
  
 MACF, 11  
 Mad, 48  
     Mad2, 48  
 Maintenance Of Heterozygosity (MOH), 86  
 MAPs, 11  
 MCAK, 11  
 Membrane  
     apicale, 3, 5, 46, 56, 64–66  
     baso-latérale, 5  
     latérale, 5, 15, 20, 46, 137  
 Mesoderme, 62, 63, 75  
 Microtubule, 7–13, 20, 25, 27, 28, 35, 38, 41–49, 55, 84, 138, 139, 141, 142, 144–146  
     astériens, 1, 9–11, 17, 22, 23, 25, 27, 34, 35, 40, 42, 48, 51, 56, 139

bout  $\ominus$ , 7, 9, 25, 27, 41  
 bout  $\oplus$ , 7, 11, 35, 42, 46  
 kinétochoriens, 9, 10, 21, 39, 48  
 polaires, 22, 47  
 Microtubule-Organizing Center (MTOC), 7,  
     8, 10, 42, 49, 137  
 Min  
     Min, souris, 47, 77, 81–84, 86, 144  
 Miranda, 16, 19, 22, 34  
 Moésine, 56  
 Mud, 17, 23, 26, 34, 35, 38, 39  
 Myo2p, 42, 43  
 Myosine X, 56  
  
 NEB, 5, 8  
 Neuroblaste, 4, 11, 12, 15, 16, 18–22, 35, 38,  
     51, 143, 146  
 Notch Intracellular Domain (NICD), 66  
 Noggin, 63  
 Notch, 19, 63, 66–68, 71  
 Num1p, 42  
 NuMA, 9, 17, 19, 23, 25–28, 34, 38, 39, 140  
 Numb, 14–16, 19, 22, 36  
  
 Oriented Cell Division (OCD), 2, 57  
  
 p150<sup>Glued</sup>, 11, 41  
 p53, 59, 73  
 Pac1p, 42  
 PAR, 15–19, 21, 22, 29, 30, 35, 141  
     PAR-1, 18  
     PAR-2, 18, 22, 29  
     PAR-3, 15, 18, 19, 21, 22, 29  
     PAR-5, 18  
     PAR-6, 18, 19, 29  
 PDZ, 45, 137  
 PI(3)K, 56  
 Pins, 11, 15–17, 19, 20, 22, 26, 30, 34–39  
 Rat PIRC, 82, 84–86  
 PKC-3, 18  
 PKD1, 65  
 PKD2, 65  
 Planar Cell Polarity (PCP), 3, 15, 36, 57,  
     68, 141–143, 146  
 Poisson zèbre (*Danio rerio*), 6, 52, 57, 58  
 poly-l-lysine, 56  
 Polycystose rénale, 65  
 Polype, 59, 64, 70, 77–83  
 Pon, 14, 19  
 PP2, 53  
 PP2A, 45  
 Prickle, 3  
 Prospero, 16, 19, 51  
 PtdIns(3,4,5)P3, 56  
 PTEN, 56  
 PTK2, 45  
  
 Rac, 45, 141  
 Radixine, 56  
 RGS, 24  
 Ric-8, 13, 17, 23, 24, 28, 31–33, 35–37  
 ROCK, 56  
  
 Sérotonine, 61  
 SAC, 48  
 SAMP, 45, 50, 51  
 Scribble, 45, 137, 138  
 Sensory Organ Precursor (SOP), 14, 15, 18,  
     19, 22, 23  
 Serrate, 66  
*Sicyonia ingentis*, 2  
 Somatostatine, 61  
 Src, 44, 53  
 Strabismus, 3  
  
 TCF, 69, 70  
 TPR, 25, 34  
 Tube rénal, 57, 65, 142, 143  
  
 VanGogh, 3  
  
 Wnt, 15, 20, 44, 45, 50, 51, 57, 63, 66–71,  
     138, 142, 144–146  
     PCP, cf Planar Cell Polarity, 15  
     Wnt Ca<sup>2+</sup>, 68  
  
 XMAP215, 11

# Bibliographie

- Afshar, K., Willard, F., Colombo, K., Johnston, C., McCudden, C., Siderovski, D., & Gonczy, P. (2004). Ric-8 is required for gpr-1/2-dependent galpha function during asymmetric division of *c. elegans* embryos. *Cell* 119 (2), 219–30.
- Afshar, K., Willard, F., Colombo, K., Siderovski, D., & Gonczy, P. (2005). Cortical localization of the galpha protein gpa-16 requires ric-8 function during *c. elegans* asymmetric cell division. *Development* 132 (20), 4449–59.
- Ahmed, Y., Nouri, A., & Wieschaus, E. (2002). *Drosophila* apc1 and apc2 regulate wingless transduction throughout development. *Development* 129 (7), 1751–62.
- Ahringer, J. (2003). Control of cell polarity and mitotic spindle positioning in animal cells. *Curr Opin Cell Biol* 15 (1), 73–81.
- Akhmanova, A. & Steinmetz, M. (2008). Tracking the ends : a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (4), 309–22.
- Akong, K., Grevengoed, E. E., Price, M. H., McCartney, B. M., Hayden, M. A., DeNofrio, J. C., & Peifer, M. (2002a). *Drosophila* apc2 and apc1 play overlapping roles in wingless signaling in the embryo and imaginal discs. *Dev Biol* 250 (1), 91–100.
- Akong, K., McCartney, B. M., & Peifer, M. (2002b). *Drosophila* apc2 and apc1 have overlapping roles in the larval brain despite their distinct intracellular localizations. *Dev Biol* 250 (1), 71–90.
- Amos-Landgraf, J., Kwong, L., Kendzioriski, C., Reichelderfer, M., Torrealba, J., Weichert, J., Haag, J., Chen, K., Waller, J., Gould, M., & Dove, W. (2007). A target-selected apc-mutant rat kindred enhances the modeling of familial human colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (10), 4036–41.
- Andreu, P., Colnot, S., Godard, C., Gad, S., Chafey, P., Niwa-Kawakita, M., Laurent-Puig, P., Kahn, A., Robine, S., Perret, C., & Romagnolo, B. (2005). Crypt-restricted proliferation and commitment to the paneth cell lineage following apc loss in the mouse intestine. *Development* 132 (6), 1443–51.
- Aoki, K., Aoki, M., Sugai, M., Harada, N., Miyoshi, H., Tsukamoto, T., Mizoshita, T., Tatematsu, M., Seno, H., Chiba, T., Oshima, M., Hsieh, C.-L., & Taketo, M. M. (2007). Chromosomal instability by beta-catenin/tcf transcription in apc or beta-catenin mutant cells. *Oncogene* 26 (24), 3511–20.
- Armakolas, A. & Klar, A. J. S. (2006). Cell type regulates selective segregation of mouse chromosome 7 dna strands in mitosis. *Science* 311 (5764), 1146–49.

- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M., & Sherlock, G. (2000). Gene ontology : tool for the unification of biology. the gene ontology consortium. *Nat Genet* 25 (1), 25–29.
- Baena-López, L. A., Baonza, A., & García-Bellido, A. (2005). The orientation of cell divisions determines the shape of drosophila organs. *Curr Biol* 15 (18), 1640–44.
- Baker, J. & Garrod, D. (1993). Epithelial cells retain junctions during mitosis. *J Cell Sci* 104 ( Pt 2), 415–425.
- Bammler, T., Beyer, R. P., Bhattacharya, S., Boorman, G. A., Boyles, A., Bradford, B. U., Bumgarner, R. E., Bushel, P. R., Chaturvedi, K., Choi, D., Cunningham, M. L., Deng, S., Dressman, H. K., Fannin, R. D., Farin, F. M., Freedman, J. H., Fry, R. C., Harper, A., Humble, M. C., Hurban, P., Kavanagh, T. J., Kaufmann, W. K., Kerr, K. F., Jing, L., Lapidus, J. A., Lasarev, M. R., Li, J., Li, Y.-J., Lobenhofer, E. K., Lu, X., Malek, R. L., Milton, S., Nagalla, S. R., O'malley, J. P., Palmer, V. S., Pattee, P., Paules, R. S., Perou, C. M., Phillips, K., Qin, L.-X., Qiu, Y., Quigley, S. D., Rodland, M., Rusyn, I., Samson, L. D., Schwartz, D. A., Shi, Y., Shin, J.-L., Sieber, S. O., Slifer, S., Speer, M. C., Spencer, P. S., Sproles, D. I., Swenberg, J. A., Suk, W. A., Sullivan, R. C., Tian, R., Tennant, R. W., Todd, S. A., Tucker, C. J., Houten, B. V., Weis, B. K., Xuan, S., Zarbl, H., & of the Toxicogenomics Research Consortium, M. (2005). Standardizing global gene expression analysis between laboratories and across platforms. *Nat Methods* 2 (5), 351–356.
- Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegbarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P. J., & Clevers, H. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *lgr5*. *Nature* 449 (7165), 1003–07.
- Battle, E., Bacani, J., Begthel, H., Jonkheer, S., Gregorieff, A., van de Born, M., Malats, N., Sancho, E., Boon, E., Pawson, T., Gallinger, S., Pals, S., & Clevers, H. (2005). Ephb receptor activity suppresses colorectal cancer progression. *Nature* 435 (7045), 1126–30.
- Battle, E., Henderson, J., Begthel, H., van den Born, M., Sancho, E., Huls, G., Meeldijk, J., Robertson, J., van de Wetering, M., Pawson, T., & Clevers, H. (2002). Beta-catenin and *tcf* mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of *ephb/ephrinb*. *Cell* 111 (2), 251–63.
- Bellaïche, Y., Gho, M., Kaltschmidt, J., Brand, A., & Schweisguth, F. (2001a). *Frizzled* regulates localization of cell-fate determinants and mitotic spindle rotation during asymmetric cell division. *Nat Cell Biol* 3 (1), 50–57.
- Bellaïche, Y., Radovic, A., Woods, D., Hough, C., Parmentier, M., O’Kane, C., Bryant, P., & Schweisguth, F. (2001b). The partner of *inscuteable/discs-large* complex is required to establish planar polarity during asymmetric cell division in *drosophila*. *Cell* 106 (3), 355–66.
- Bennett, F. C. & Harvey, K. F. (2006). Fat cadherin modulates organ size in *drosophila* via the *salvador/warts/hippo* signaling pathway. *Curr Biol* 16 (21), 2101–10.
- Bird, R. (1987). Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen : preliminary findings. *Cancer Lett* 3 (2), 147–51.

- Blenkinsopp, W. K. (1967). Proliferation of respiratory tract epithelium in the rat. *Exp Cell Res* 46 (1), 144–154.
- Blumer, J., Kuriyama, R., Gettys, T., & Lanier, S. (2006). The g-protein regulatory (gpr) motif-containing leu-gly-asn-enriched protein (lgn) and galpha3 influence cortical positioning of the mitotic spindle poles at metaphase in symmetrically dividing mammalian cells. *Eur J Cell Biol* 85 (12), 1233–40.
- Boman, B., Walters, R., Fields, J., Kovatich, A., Zhang, T., Isenberg, G., Goldstein, S., & Palazzo, J. (2004). Colonic crypt changes during adenoma development in familial adenomatous polyposis : immunohistochemical evidence for expansion of the crypt base cell population. *Am J Pathol* 165 (5), 1489–98.
- Boman, B. M., Fields, J. Z., Bonham-Carter, O., & Runquist, O. A. (2001). Computer modeling implicates stem cell overproduction in colon cancer initiation. *Cancer Res* 61 (23), 8408–11.
- Boman, B. M. & Huang, E. (2008). Human colon cancer stem cells : a new paradigm in gastrointestinal oncology. *J Clin Oncol* 26 (17), 2828–2838.
- Boman, B. M., Wicha, M. S., Fields, J. Z., & Runquist, O. A. (2007). Symmetric division of cancer stem cells—a key mechanism in tumor growth that should be targeted in future therapeutic approaches. *Clin Pharmacol Ther* 81 (6), 893–98.
- Bonaccorsi, S., Mottier, V., Giansanti, M., Bolkan, B., Williams, B., Goldberg, M., & Gatti, M. (2007). The drosophila lkb1 kinase is required for spindle formation and asymmetric neuroblast division. *Development* 134 (11), 2183–93.
- Booth, C., O’Shea, J., & Potten, C. (1999). Maintenance of functional stem cells in isolated and cultured adult intestinal epithelium. *Exp Cell Res* 249 (2), 359–66.
- Borgne, R., Bardin, A., & Schweisguth, F. (2005). The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating notch signaling. *Development* 132 (8), 1751–62.
- Borgne, R., Bellaiche, Y., & Schweisguth, F. (2002). Drosophila e-cadherin regulates the orientation of asymmetric cell division in the sensory organ lineage. *Curr Biol* 12 (2), 95–104.
- Bowman, S., Neumuller, R., Novatchkova, M., Du, Q., & Knoblich, J. (2006). The drosophila numa homolog mud regulates spindle orientation in asymmetric cell division. *Dev Cell* 10 (6), 731–42.
- Brocardo, M., Näthke, I. S., & Henderson, B. R. (2005). Redefining the subcellular location and transport of apc : new insights using a panel of antibodies. *EMBO Rep* 6 (2), 184–90.
- Busson, S., Dujardin, D., Moreau, A., Dompierre, J., & Mey, J. (1998). Dynein and dynactin are localized to astral microtubules and at cortical sites in mitotic epithelial cells. *Curr Biol* 8, 541–4.
- Cairns, J. (1975). Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature* 255 (5505), 197–200.

- Caldwell, C., Green, R., & Kaplan, K. (2007). Apc mutations lead to cytokinetic failures in vitro and tetraploid genotypes in min mice. *J Cell Biol* 178 (7), 1109–20.
- Castillejo-López, C., Arias, W. M., & Baumgartner, S. (2004). The fat-like gene of drosophila is the true orthologue of vertebrate fat cadherins and is involved in the formation of tubular organs. *J Biol Chem* 279 (23), 24034–43.
- Caussinus, E. & Gonzalez, C. (2005). Induction of tumor growth by altered stem-cell asymmetric division in drosophila melanogaster. *Nat Genet* 37 (10), 1125–9.
- Chen, K. C., Calzone, L., Csikasz-Nagy, A., Cross, F. R., Novak, B., & Tyson, J. J. (2004). Integrative analysis of cell cycle control in budding yeast. *Mol Biol Cell* 15 (8), 3841–62.
- Cheng, H., Bjerknes, M., Amar, J., & Gardiner, G. (1986). Crypt production in normal and diseased human colonic epithelium. *Anat Rec* 216 (1), 44–8.
- Colnot, S., Niwa-Kawakita, M., Hamard, G., Godard, C., Plenier, S., Houbron, C., Romagnolo, B., Berrebi, D., Giovannini, M., & Perret, C. (2004). Colorectal cancers in a new mouse model of familial adenomatous polyposis : influence of genetic and environmental modifiers. *Lab Invest* 84 (12), 1619–30.
- Colombo, K., Grill, S., Kimple, R., Willard, F., Siderovski, D., & Gonczy, P. (2003). Translation of polarity cues into asymmetric spindle positioning in caenorhabditis elegans embryos. *Science* 300 (5627), 1957–61.
- Concha, M. & Adams, R. (1998). Oriented cell divisions and cellular morphogenesis in the zebrafish gastrula and neurula : a time-lapse analysis. *Development* 125 (6), 983–94.
- Coquelle, F., Caspi, M., Cordelieres, F., Dompierre, J., Dujardin, D., Koifman, C., Martin, P., Hoogenraad, C., Akhmanova, A., Galjart, N., Mey, J., & Reiner, O. (2002). Lis1, clip-170's key to the dynein/dynactin pathway. *Mol Cell Biol* 22 (9), 3089–102.
- Couwenbergs, C., Labbe, J., Goulding, M., Marty, T., Bowerman, B., & Gotta, M. (2007). Heterotrimeric g protein signaling functions with dynein to promote spindle positioning in c. elegans. *J Cell Biol* 179 (1), 15–22.
- Couwenbergs, C., Spilker, A., & Gotta, M. (2004). Control of embryonic spindle positioning and galpha activity by c. elegans ric-8. *Curr Biol* 14 (20), 1871–6.
- Das, T., Payer, B., Cayouette, M., & Harris, W. A. (2003). In vivo time-lapse imaging of cell divisions during neurogenesis in the developing zebrafish retina. *Neuron* 37 (4), 597–609.
- David, N., Martin, C., Segalen, M., Rosenfeld, F., Schweisguth, F., & Bellaiche, Y. (2005). Drosophila ric-8 regulates galphai cortical localization to promote galphai-dependent planar orientation of the mitotic spindle during asymmetric cell division. *Nat Cell Biol* 7 (11), 1083–90.
- de Santa Barbara, P., van den Brink, G. R., & Roberts, D. J. (2003). Development and differentiation of the intestinal epithelium. *Cell Mol Life Sci* 60 (7), 1322–32.

- Dikovskaya, D., Schiffmann, D., Newton, I., Oakley, A., Kroboth, K., Sansom, O., Jamieson, T., Meniel, V., Clarke, A., & Nathke, I. (2007). Loss of *apc* induces polyploidy as a result of a combination of defects in mitosis and apoptosis. *J Cell Biol* 176 (2), 183–95.
- Draviam, V., Shapiro, I., Aldridge, B., & Sorger, P. (2006). Misorientation and reduced stretching of aligned sister kinetochores promote chromosome missegregation in *eb1-* or *apc-*depleted cells. *Embo J* 25 (12), 2814–27.
- Du, Q. & Macara, I. (2004). Mammalian pins is a conformational switch that links *numa* to heterotrimeric G proteins. *Cell* 119 (4), 503–16.
- Du, Q., Stukenberg, P., & Macara, I. (2001). A mammalian partner of inscuteable binds *numa* and regulates mitotic spindle organization. *Nat Cell Biol* 3 (12), 1069–75.
- Du, Q., Taylor, L., Compton, D., & Macara, I. (2002). Lgn blocks the ability of *numa* to bind and stabilize microtubules. a mechanism for mitotic spindle assembly regulation. *Curr Biol* 12 (22), 1928–33.
- Dujardin, D., Barnhart, L., Stehman, S., Gomes, E., Gundersen, G., & Vallee, R. (2003). A role for cytoplasmic dynein and *lis1* in directed cell movement. *J Cell Biol* 163 (6), 1205–11.
- Dujardin, D., Wacker, U., Moreau, A., Schroer, T., Rickard, J., & Mey, J. (1998). Evidence for a role of *clip-170* in the establishment of metaphase chromosome alignment. *J Cell Biol* 141 (4), 849–62.
- Duluc, I., Lorentz, O., Fritsch, C., Leberquier, C., Kedinger, M., & Freund, J. N. (1997). Changing intestinal connective tissue interactions alters homeobox gene expression in epithelial cells. *J Cell Sci* 110 ( Pt 11), 1317–24.
- Dzhindzhev, N. S., Rogers, S. L., Vale, R. D., & Ohkura, H. (2005). Distinct mechanisms govern the localisation of *drosophila clip-190* to unattached kinetochores and microtubule plus-ends. *J Cell Sci* 118 (Pt 16), 3781–90.
- Enright, A. J., Dongen, S. V., & Ouzounis, C. A. (2002). An efficient algorithm for large-scale detection of protein families. *Nucleic Acids Res* 30 (7), 1575–84.
- Erfle, H., Neumann, B., Liebel, U., Rogers, P., Held, M., Walter, T., Ellenberg, J., & Pepperkok, R. (2007). Reverse transfection on cell arrays for high content screening microscopy. *Nat Protoc* 2 (2), 392–9.
- Erfle, H., Simpson, J. C., Bastiaens, P. I. H., & Pepperkok, R. (2004). siRNA cell arrays for high-content screening microscopy. *Biotechniques* 37 (3), 454–8.
- Es, J., Gijn, M., Riccio, O., Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D., Radtke, F., & Clevers, H. (2005). Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* 435 (7044), 959–63.
- Etienne-Manneville, S. & Hall, A. (2001). Integrin-mediated activation of *cdc42* controls cell polarity in migrating astrocytes through *pkczeta*. *Cell* 106 (4), 489–98.

- Etienne-Manneville, S. & Hall, A. (2003). Cdc42 regulates gsk-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature* 421 (6924), 753–6.
- Etienne-Manneville, S., Manneville, J., Nicholls, S., Ferenczi, M., & Hall, A. (2005). Cdc42 and par6-pkc-zeta regulate the spatially localized association of dlg1 and apc to control cell polarization. *J Cell Biol* 170 (6), 895–901.
- Fant, X., Merdes, A., & Haren, L. (2004). Cell and molecular biology of spindle poles and numa. *Int Rev Cytol* 238, 1–57.
- Faulkner, N. E., Dujardin, D. L., Tai, C. Y., Vaughan, K. T., O'Connell, C. B., Wang, Y., & Vallee, R. B. (2000). A role for the lissencephaly gene *lis1* in mitosis and cytoplasmic dynein function. *Nat Cell Biol* 2 (11), 784–791.
- Faux, M. C., Ross, J. L., Meeker, C., Johns, T., Ji, H., Simpson, R. J., Layton, M. J., & Burgess, A. W. (2004). Restoration of full-length adenomatous polyposis coli (*apc*) protein in a colon cancer cell line enhances cell adhesion. *J Cell Sci* 117 (Pt 3), 427–39.
- Fearon, E. R. & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61 (5), 759–67.
- Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., Heanue, M., Colombet, M., & Boyle, P. (2007). Estimates of the cancer incidence and mortality in europe in 2006. *Ann Oncol* 18 (3), 581–92.
- Fernandez-Minan, A., Martin-Bermudo, M., & Gonzalez-Reyes, A. (2007). Integrin signaling regulates spindle orientation in drosophila to preserve the follicular-epithelium monolayer. *Curr Biol* 17 (8), 683–8.
- Fevr, T., Robine, S., Louvard, D., & Huelsken, J. (2007). Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. *Mol Cell Biol* 27 (21), 7551–9.
- Fischer, E., Legue, E., Doyen, A., Nato, F., Nicolas, J.-F., Torres, V., Yaniv, M., & Pontoglio, M. (2006). Defective planar cell polarity in polycystic kidney disease. *Nat Genet* 38 (1), 21–23.
- Fishell, G. & Kriegstein, A. R. (2003). Neurons from radial glia : the consequences of asymmetric inheritance. *Curr Opin Neurobiol* 13 (1), 34–41.
- Fleming, E., Zajac, M., Moschenross, D., Montrose, D., Rosenberg, D., Cowan, A., & Tirnauer, J. (2007). Planar spindle orientation and asymmetric cytokinesis in the mouse small intestine. *J Histochem Cytochem* 55 (11), 1173–80.
- Fodde, R., Edelmann, W., Yang, K., van Leeuwen, C., Carlson, C., Renault, B., Breukel, C., Alt, E., Lipkin, M., & Khan, P. M. (1994). A targeted chain-termination mutation in the mouse *apc* gene results in multiple intestinal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (19), 8969–73.
- Fodde, R., Kuipers, J., Rosenberg, C., Smits, R., Kielman, M., Gaspar, C., Es, J., Breukel, C., Wiegant, J., Giles, R., & Clevers, H. (2001). Mutations in the *apc* tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol* 3 (4), 433–38.

- Fodde, R., Smits, R., Hofland, N., Kielman, M., & Khan, P. (1999). Mechanisms of apc-driven tumorigenesis : lessons from mouse models. *Cytogenet Cell Genet* 86 (2), 105–11.
- Fre, S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D., & Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature* 435 (7044), 964–8.
- Fuja, T., Schwartz, P., Darcy, D., & Bryant, P. (2004). Asymmetric localization of lgn but not ags3, two homologs of drosophila pins, in dividing human neural progenitor cells. *J Neurosci Res* 75 (6), 782–93.
- Fujimitsu, Y., Nakanishi, H., Inada, K., Yamachika, T., Ichinose, M., Fukami, H., & Tatematsu, M. (1996). Development of aberrant crypt foci involves a fission mechanism as revealed by isolation of aberrant crypts. *Jpn J Cancer Res* 87 (12), 1199–203.
- Fujiwara, T., Kawakatsu, T., Tayama, S., Kobayashi, Y., Sugiura, N., Kimata, K., & Takai, Y. (2008). Hyaluronan-cd44 pathway regulates orientation of mitotic spindle in normal epithelial cells. *Genes Cells* 13 (7), 759–70.
- Fukata, M., Watanabe, T., Noritake, J., Nakagawa, M., Yamaga, M., Kuroda, S., Matsuura, Y., Iwamatsu, A., Perez, F., & Kaibuchi, K. (2002). Rac1 and cdc42 capture microtubules through iqgap1 and clip-170. *Cell* 109 (7), 873–85.
- Galjart, N. (2005). Clips and clasps and cellular dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (6), 487–98.
- Gho, M. & Schweisguth, F. (1998). Frizzled signalling controls orientation of asymmetric sense organ precursor cell divisions in drosophila. *Nature* 393 (6681), 178–81.
- Gibson, M. & Perrimon, N. (2003). Apicobasal polarization : epithelial form and function. *Curr Opin Cell Biol* 15 (6), 747–52.
- Goldstein, B. & Macara, I. (2007). The par proteins : fundamental players in animal cell polarization. *Dev Cell* 13 (5), 609–22.
- Gonczy, P. (2008). Mechanisms of asymmetric cell division : flies and worms pave the way. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (5), 355–66.
- Gonczy, P., Echeverri, C., Oegema, K., Coulson, A., Jones, S., Copley, R., Duperon, J., Oegema, J., Brehm, M., Cassin, E., Hannak, E., Kirkham, M., Pichler, S., Flohrs, K., Goessen, A., Leidel, S., Alleaume, A., Martin, C., Ozlu, N., Bork, P., & Hyman, A. (2000). Functional genomic analysis of cell division in *c. elegans* using rna interference of genes on chromosome iii. *Nature* 408 (6810), 331–6.
- Gong, Y., Mo, C., & Fraser, S. E. (2004). Planar cell polarity signalling controls cell division orientation during zebrafish gastrulation. *Nature* 430 (7000), 689–93.
- Goto, T., Davidson, L., Asashima, M., & Keller, R. (2005). Planar cell polarity genes regulate polarized extracellular matrix deposition during frog gastrulation. *Curr Biol* 15 (8), 787–93.

- Gotta, M. & Ahringer, J. (2001). Distinct roles for galpha and gbetagamma in regulating spindle position and orientation in caenorhabditis elegans embryos. *Nat Cell Biol* 3 (3), 297–300.
- Gotta, M., Dong, Y., Peterson, Y., Lanier, S., & Ahringer, J. (2003). Asymmetrically distributed c. elegans homologs of ags3/pins control spindle position in the early embryo. *Curr Biol* 13 (12), 1029–37.
- Green, R. & Kaplan, K. (2003). Chromosome instability in colorectal tumor cells is associated with defects in microtubule plus-end attachments caused by a dominant mutation in apc. *J Cell Biol* 163 (5), 949–61.
- Green, R., Wollman, R., & Kaplan, K. (2005). Apc and eb1 function together in mitosis to regulate spindle dynamics and chromosome alignment. *Mol Biol Cell* 16, 4609–22.
- Grill, S., Gonczy, P., Stelzer, E., & Hyman, A. (2001). Polarity controls forces governing asymmetric spindle positioning in the caenorhabditis elegans embryo. *Nature* 409 (6820), 630–3.
- Grill, S., Howard, J., Schaffer, E., Stelzer, E., & Hyman, A. (2003). The distribution of active force generators controls mitotic spindle position. *Science* 301 (5632), 518–21.
- Haber, J. E. (2006). Comment on "cell type regulates selective segregation of mouse chromosome 7 dna strands in mitosis". *Science* 313 (5790), 1045.
- Hadjihannas, M. V., Brückner, M., Jerchow, B., Birchmeier, W., Dietmaier, W., & Behrens, J. (2006). Aberrant wnt/beta-catenin signaling can induce chromosomal instability in colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (28), 10747–52.
- Haffen, K., Kedinger, M., & Simon-Assmann, P. (1987). Mesenchyme-dependent differentiation of epithelial progenitor cells in the gut. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 6 (1), 14–23.
- Hampoelz, B., Hoeller, O., Bowman, S., Dunican, D., & Knoblich, J. (2005). Drosophila ric-8 is essential for plasma-membrane localization of heterotrimeric g proteins. *Nat Cell Biol* 7 (11), 1099–105.
- Haramis, A.-P. G., Begthel, H., van den Born, M., van Es, J., Jonkheer, S., Offerhaus, G. J. A., & Clevers, H. (2004). De novo crypt formation and juvenile polyposis on bmp inhibition in mouse intestine. *Science* 303 (5664), 1684–6.
- Hata, K., Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Qiang, S., Yamada, Y., Oyama, T., Kuno, T., Hirose, Y., Hara, A., & Mori, H. (2006). beta-catenin-accumulated crypts in the colonic mucosa of juvenile apcmin/+ mice. *Cancer Lett* 239 (1), 123–8.
- He, X. C., Zhang, J., Tong, W.-G., Tawfik, O., Ross, J., Scoville, D. H., Tian, Q., Zeng, X., He, X., Wiedemann, L. M., Mishina, Y., & Li, L. (2004). Bmp signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of wnt-beta-catenin signaling. *Nat Genet* 36 (10), 1117–21.
- Heald, R., Tournebise, R., Blank, T., Sandaltzopoulos, R., Becker, P., Hyman, A., & Karsenti, E. (1996). Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in xenopus egg extracts. *Nature* 382 (6590), 420–5.

- Hebbar, S., Guillotte, A., Mesngon, M., Zhou, Q., Wynshaw-Boris, A., & Smith, D. (2008). Genetic enhancement of the *lis1*+/- phenotype by a heterozygous mutation in the adenomatous polyposis coli gene. *Dev Neurosci* 30 (1), 157–70.
- Hennetin, J. & Bellis, M. (2006). Clustering methods for analyzing large data sets : gonad development, a study case. *Methods Enzymol* 411, 387–407.
- Hertzler, P. L. & Clark, W. H. (1992). Cleavage and gastrulation in the shrimp *Sicyonia ingentis* : invagination is accompanied by oriented cell division. *Development* 116 (1), 127–40.
- Hirose, Y., Kuno, T., Yamada, Y., Sakata, K., Katayama, M., Yoshida, K., Qiao, Z., Hata, K., Yoshimi, N., & Mori, H. (2003). Azoxymethane-induced beta-catenin-accumulated crypts in colonic mucosa of rodents as an intermediate biomarker for colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 24 (1), 107–11.
- Höök, P. & Vallee, R. B. (2006). The dynein family at a glance. *J Cell Sci* 119 (Pt 21), 4369–71.
- Hogan, B. & Kolodziej, P. (2002). Organogenesis : molecular mechanisms of tubulogenesis. *Nat Rev Genet* 3 (7), 513–23.
- Holmberg, J., Genander, M., Halford, M., Anneren, C., Sondell, M., Chumley, M., Silvan, R., Henkemeyer, M., & Frisen, J. (2006). Ephb receptors coordinate migration and proliferation in the intestinal stem cell niche. *Cell* 125 (6), 1151–63.
- Howe, J. R., Bair, J. L., Sayed, M. G., Anderson, M. E., Mitros, F. A., Petersen, G. M., Velculescu, V. E., Traverso, G., & Vogelstein, B. (2001). Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1a in juvenile polyposis. *Nat Genet* 28 (2), 184–7.
- Huisman, S. M. & Segal, M. (2005). Cortical capture of microtubules and spindle polarity in budding yeast - where's the catch? *J Cell Sci* 118 (Pt 3), 463–71.
- Hyman, A. A. & White, J. G. (1987). Determination of cell division axes in the early embryogenesis of *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 105 (5), 2123–35.
- Ikeshima-Kataoka, H., Skeath, J. B., Nabeshima, Y., Doe, C. Q., & Matsuzaki, F. (1997). Miranda directs prospero to a daughter cell during *Drosophila* asymmetric divisions. *Nature* 390 (6660), 625–9.
- Ireland, H., Kemp, R., Houghton, C., Howard, L., Clarke, A. R., Sansom, O. J., & Winton, D. J. (2004). Inducible cre-mediated control of gene expression in the murine gastrointestinal tract : effect of loss of beta-catenin. *Gastroenterology* 126 (5), 1236–46.
- Irizarry, R. A., Warren, D., Spencer, F., Kim, I. F., Biswal, S., Frank, B. C., Gabrielson, E., Garcia, J. G. N., Geoghegan, J., Germino, G., Griffin, C., Hilmer, S. C., Hoffman, E., Jedlicka, A. E., Kawasaki, E., Martínez-Murillo, F., Morsberger, L., Lee, H., Petersen, D., Quackenbush, J., Scott, A., Wilson, M., Yang, Y., Ye, S. Q., & Yu, W. (2005). Multiple-laboratory comparison of microarray platforms. *Nat Methods* 2 (5), 345–50.
- Istrail, S., De-Leon, S. B.-T., & Davidson, E. H. (2007). The regulatory genome and the computer. *Dev Biol* 310 (2), 187–95.

- Izumi, Y., Ohta, N., Hisata, K., Raabe, T., & Matsuzaki, F. (2006). *Drosophila* pins-binding protein nud regulates spindle-polarity coupling and centrosome organization. *Nat Cell Biol* 8 (6), 586–93.
- Kaplan, K., Burds, A., Swedlow, J., Bekir, S., Sorger, P., & Nathke, I. (2001). A role for the adenomatous polyposis coli protein in chromosome segregation. *Nat Cell Biol* 3 (4), 429–32.
- Kaushik, R., Yu, F., Chia, W., Yang, X., & Bahri, S. (2003). Subcellular localization of lgn during mitosis : evidence for its cortical localization in mitotic cell culture systems and its requirement for normal cell cycle progression. *Mol Biol Cell* 14 (8), 3144–55.
- Kayahara, T., Sawada, M., Takaishi, S., Fukui, H., Seno, H., Fukuzawa, H., Suzuki, K., Hiai, H., Kageyama, R., Okano, H., & Chiba, T. (2003). Candidate markers for stem and early progenitor cells, *musashi-1* and *hes1*, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine. *FEBS Lett* 535 (1), 131–5.
- Kemphues, K., Priess, J., Morton, D., & Cheng, N. (1988). Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *c. elegans* embryos. *Cell* 52 (3), 311–20.
- Kimple, R., Willard, F., & Siderovski, D. (2002). The *goloco* motif : heralding a new tango between g protein signaling and cell division. *Mol Interv* 2 (2), 88–100.
- Kinzler, K. & Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87 (2), 159–70.
- Klaus, A. & Birchmeier, W. (2008). Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer* 8 (5), 387–98.
- Knoblich, J. (2008). Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell* 132 (4), 583–97.
- Knoblich, J. A., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (1995). Asymmetric segregation of *numb* and *prospero* during cell division. *Nature* 377 (6550), 624–7.
- Komarova, Y., Vorobjev, I., & Borisy, G. (2002a). Life cycle of *mts* : persistent growth in the cell interior, asymmetric transition frequencies and effects of the cell boundary. *J Cell Sci* 115 (17), 3527–39.
- Komarova, Y. A., Akhmanova, A. S., Kojima, S.-I., Galjart, N., & Borisy, G. G. (2002b). Cytoplasmic linker proteins promote microtubule rescue in vivo. *J Cell Biol* 159 (4), 589–99.
- Konno, D., Shioi, G., Shitamukai, A., Mori, A., Kiyonari, H., Miyata, T., & Matsuzaki, F. (2008). Neuroepithelial progenitors undergo lgn-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. *Nat Cell Biol* 10 (1), 93–101.
- Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P. J., & Clevers, H. (1998). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking *tcf-4*. *Nat Genet* 19 (4), 379–83.
- Kouzmenko, A. P., Takeyama, K., Kawasaki, Y., Akiyama, T., & Kato, S. (2008). Truncation mutations abolish chromatin-associated activities of adenomatous polyposis coli. *Oncogene* 27 (36), 4888–99.

- Kozłowski, C., Srayko, M., & Nedelec, F. (2007). Cortical microtubule contacts position the spindle in *c. elegans* embryos. *Cell* 129 (3), 499–510.
- Kraut, R., Chia, W., Jan, L. Y., Jan, Y. N., & Knoblich, J. A. (1996). Role of inscuteable in orienting asymmetric cell divisions in *drosophila*. *Nature* 383 (6595), 50–5.
- Kroboth, K., Newton, I. P., Kita, K., Dikovskaya, D., Zumbunn, J., Waterman-Storer, C. M., & Näthke, I. S. (2007). Lack of adenomatous polyposis coli protein correlates with a decrease in cell migration and overall changes in microtubule stability. *Mol Biol Cell* 18 (3), 910–8.
- Kuchinke, U., Grawe, F., & Knust, E. (1998). Control of spindle orientation in *drosophila* by the par-3-related pdz-domain protein bazooka. *Curr Biol* 8 (25), 1357–65.
- Kuo, W. P., Jenssen, T.-K., Butte, A. J., Ohno-Machado, L., & Kohane, I. S. (2002). Analysis of matched mRNA measurements from two different microarray technologies. *Bioinformatics* 18 (3), 405–12.
- Labbé, J. C., Maddox, P. S., Salmon, E. D., & Goldstein, B. (2003). Par proteins regulate microtubule dynamics at the cell cortex in *c. elegans*. *Curr Biol* 13 (9), 707–14.
- Langford, K., Askham, J., Lee, T., Adams, M., & Morrison, E. (2006a). Examination of actin and microtubule dependent APC localisations in living mammalian cells. *BMC Cell Biol* 7 (1), 3.
- Langford, K., Lee, T., Askham, J., & Morrison, E. (2006b). Adenomatous polyposis coli localization is both cell type and cell context dependent. *Cell Motil Cytoskeleton* 63 (8), 483–92.
- Laprise, P., Chailier, P., Houde, M., Beaulieu, J.-F., Boucher, M.-J., & Rivard, N. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *J Biol Chem* 277 (10), 8226–34.
- Laprise, P., Viel, A., & Rivard, N. (2004). Human homolog of disc-large is required for adherens junction assembly and differentiation of human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 279 (11), 10157–66.
- Lechler, T. & Fuchs, E. (2005). Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* 437 (7056), 275–80.
- Lecuit, T. (2004). Junctions and vesicular trafficking during *drosophila* cellularization. *J Cell Sci* 117 (Pt 16), 3427–33.
- Lee, H. K., Hsu, A. K., Sajdak, J., Qin, J., & Pavlidis, P. (2004). Coexpression analysis of human genes across many microarray data sets. *Genome Res* 14 (6), 1085–94.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1997). Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 386 (6625), 623–27.
- Li, K.-C. (2002). Genome-wide coexpression dynamics : theory and application. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (26), 16875–80.

- Li, L. & Xie, T. (2005). Stem cell niche : structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 605–31.
- Li, X., Madison, B. B., Zacharias, W., Kolterud, A., States, D., & Gumucio, D. L. (2007). Deconvoluting the intestine : molecular evidence for a major role of the mesenchyme in the modulation of signaling cross talk. *Physiol Genomics* 29 (3), 290–301.
- Lin, H.-H., Hsu, H.-L., & Yeh, N.-H. (2007). Apoptotic cleavage of numa at the c-terminal end is related to nuclear disruption and death amplification. *J Biomed Sci* 14 (5), 681–94.
- Lipshutz, R. J., Fodor, S. P., Gingeras, T. R., & Lockhart, D. J. (1999). High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet* 21 (1 Suppl), 20–24.
- Lorson, M., Horvitz, H., & Heuvel, S. (2000). Lin-5 is a novel component of the spindle apparatus required for chromosome segregation and cleavage plane specification in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 148 (1), 73–86.
- Louie, R., Bahmanyar, S., Siemers, K., Votin, V., Chang, P., Stearns, T., Nelson, W., & Barth, A. (2004). Adenomatous polyposis coli and eb1 localize in close proximity of the mother centriole and eb1 is a functional component of centrosomes. *J Cell Sci* 117 (Pt 7), 1117–28.
- Lu, B., Roegiers, F., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (2001). Adherens junctions inhibit asymmetric division in the *Drosophila* epithelium. *Nature* 409 (6819), 522–25.
- Lubarsky, B. & Krasnow, M. (2003). Tube morphogenesis : making and shaping biological tubes. *Cell* 112 (1), 19–28.
- Luo, L., Shen, G., Stiffler, K., Wang, Q., Pretlow, T., & Pretlow, T. (2006). Loss of heterozygosity in human aberrant crypt foci (acf), a putative precursor of colon. *Carcinogenesis* 27 (6), 1153–9.
- Martin, D. E., Demougin, P., Hall, M. N., & Bellis, M. (2004). Rank difference analysis of microarrays (rdam), a novel approach to statistical analysis of microarray expression profiling data. *BMC Bioinformatics* 5, 148.
- Martin-Belmonte, F., Yu, W., Rodriguez-Fraticelli, A., Ewald, A., Werb, Z., Alonso, M., & Mostov, K. (2008). Cell-polarity dynamics controls the mechanism of lumen formation in epithelial morphogenesis. *Curr Biol* 18 (7), 507–13.
- Matakatsu, H. & Blair, S. S. (2006). Separating the adhesive and signaling functions of the fat and dachsous protocadherins. *Development* 133 (12), 2315–24.
- Matsumine, A., Ogai, A., Senda, T., Okumura, N., Satoh, K., Baeg, G. H., Kawahara, T., Kobayashi, S., Okada, M., Toyoshima, K., & Akiyama, T. (1996). Binding of apc to the human homolog of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Science* 272 (5264), 1020–3.
- May, R., Riehl, T., Hunt, C., Sureban, S., Anant, S., & Houchen, C. (2007). Identification of a novel putative gastrointestinal stem cell and adenoma stem cell marker : Dcamkl-1 following radiation injury and in apc/min mice. *Stem Cells* 26 (3), 630–7.

- McCartney, B. M., McEwen, D. G., Grevengoed, E., Maddox, P., Bejsovec, A., & Peifer, M. (2001). *Drosophila* *apc2* and *armadillo* participate in tethering mitotic spindles to cortical actin. *Nat Cell Biol* 3 (10), 933–38.
- McLellan, E., Medline, A., & Bird, R. (1991). Sequential analyses of the growth and morphological characteristics of aberrant crypt foci : putative preneoplastic lesions. *Cancer Res* 51 (19), 5270–4.
- Merdes, A., Ramyar, K., Vechio, J., & Cleveland, D. (1996). A complex of *numa* and cytoplasmic dynein is essential for mitotic spindle assembly. *Cell* 87 (3), 447–58.
- Merritt, A. J., Potten, C. S., Kemp, C. J., Hickman, J. A., Balmain, A., Lane, D. P., & Hall, P. A. (1994). The role of p53 in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53-deficient mice. *Cancer Res* 54 (3), 614–17.
- Mili, S., Moissoglu, K., & Macara, I. (2008). Genome-wide screen reveals *apc*-associated rnas enriched in cell protrusions. *Nature* 453 (7191), 115–9.
- Mimori-Kiyosue, Y., Matsui, C., Sasaki, H., & Tsukita, S. (2007). Adenomatous polyposis coli (*apc*) protein regulates epithelial cell migration and morphogenesis via pdz domain-based interactions with plasma membranes. *Genes Cells* 12 (2), 219–33.
- Mimori-Kiyosue, Y., Shiina, N., & Tsukita, S. (2000). The dynamic behavior of the *apc*-binding protein *eb1* on the distal ends of microtubules. *Curr Biol* 10 (14), 865–68.
- Mogensen, M. M., Tucker, J. B., Mackie, J. B., Prescott, A. R., & Näthke, I. S. (2002). The adenomatous polyposis coli protein unambiguously localizes to microtubule plus ends and is involved in establishing parallel arrays of microtubule bundles in highly polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 157 (6), 1041–8.
- Montcouquiol, M. (2007). [planar polarity in mammals : similarity and divergence with *drosophila melanogaster*]. *J Soc Biol* 201 (1), 61–7.
- Montcouquiol, M., Rachel, R. A., Lanford, P. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., & Kelley, M. W. (2003). Identification of *vangl2* and *scrbl* as planar polarity genes in mammals. *Nature* 423 (6936), 173–7.
- Moore, J., Li, J., & Cooper, J. (2008). Dynactin function in mitotic spindle positioning. *Traffic* 9 (4), 510–27.
- Moores, C. A. & Milligan, R. A. (2006). Lucky 13-microtubule depolymerisation by kinesin-13 motors. *J Cell Sci* 119 (Pt 19), 3905–13.
- Morin, X., Jaouen, F., & Durbec, P. (2007). Control of planar divisions by the g-protein regulator *lgn* maintains progenitors in the chick neuroepithelium. *Nat Neurosci* 10 (11), 1440–8.
- Morrison, E. E., Wardleworth, B. N., Askham, J. M., Markham, A. F., & Meredith, D. M. (1998). *Eb1*, a protein which interacts with the *apc* tumour suppressor, is associated with the microtubule cytoskeleton throughout the cell cycle. *Oncogene* 17 (26), 3471–7.
- Moser, A. R., Pitot, H. C., & Dove, W. F. (1990). A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* 247 (4940), 322–4.

- Nakagawa, H., Koyama, K., Monden, M., & Nakamura, Y. (1999). Analysis of apcl, a brain-specific adenomatous polyposis coli homologue, for mutations and expression in brain tumors. *Jpn J Cancer Res* 90 (9), 982–6.
- Nathke, I. (2004). The adenomatous polyposis coli protein : the achilles heel of the gut epithelium. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 337–66.
- Nédélec, F. (2002). Computer simulations reveal motor properties generating stable antiparallel microtubule interactions. *J Cell Biol* 158 (6), 1005–15.
- Neumann, B., Held, M., Liebel, U., Erfle, H., Rogers, P., Pepperkok, R., & Ellenberg, J. (2006). High-throughput rna screening by time-lapse imaging of live human cells. *Nat Methods* 3 (5), 385–390.
- Nguyen-Ngoc, T., Afshar, K., & Gonczy, P. (2007). Coupling of cortical dynein and galpha proteins mediates spindle positioning in caenorhabditis elegans. *Nat Cell Biol* 9 (11), 1294–302.
- Nipper, R., Siller, K., Smith, N., Doe, C., & Prehoda, K. (2007). Galphai generates multiple pins activation states to link cortical polarity and spindle orientation in drosophila neuroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (36), 14306–11.
- Nishimura, S., Wakabayashi, N., Toyoda, K., Kashima, K., & Mitsufuji, S. (2003). Expression of musashi-1 in human normal colon crypt cells : a possible stem cell marker of human colon epithelium. *Dig Dis Sci* 48 (8), 1523–9.
- Noles, S. R. & Chenn, A. (2007). Cadherin inhibition of beta-catenin signaling regulates the proliferation and differentiation of neural precursor cells. *Mol Cell Neurosci* 35 (4), 549–58.
- Nucci, M., Robinson, C., Longo, P., Campbell, P., & Hamilton, S. (1997). Phenotypic and genotypic characteristics of aberrant crypt foci in human colorectal mucosa. *Hum Pathol* 28 (12), 1396–407.
- O’Connell, C. & Wang, Y. (2000). Mammalian spindle orientation and position respond to changes in cell shape in a dynein-dependent fashion. *Mol Biol Cell* 11 (5), 1765–74.
- Oshima, H., Oshima, M., Kobayashi, M., Tsutsumi, M., & Taketo, M. (1997). Morphological and molecular processes of polyp formation in apc(delta716) knockout mice. *Cancer Res* 57 (9), 1644–9.
- Oshima, M., Oshima, H., Kitagawa, K., Kobayashi, M., Itakura, C., & Taketo, M. (1995a). Loss of apc heterozygosity and abnormal tissue building in nascent intestinal polyps in mice carrying a truncated apc gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (10), 4482–6.
- Oshima, M., Oshima, H., Kobayashi, M., Tsutsumi, M., & Taketo, M. (1995b). Evidence against dominant negative mechanisms of intestinal polyp formation by apc gene mutations. *Cancer Res* 55 (13), 2719–22.
- Papanikolaou, A., Wang, Q., Papanikolaou, D., Whiteley, H., & Rosenberg, D. (2000). Sequential and morphological analyses of aberrant crypt foci formation in mice of differing susceptibility to azoxymethane-induced colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21 (8), 1567–72.

- Park, D. & Rose, L. (2007). Dynamic localization of *lin-5* and *gpr-1/2* to cortical force generation domains during spindle positioning. *Dev Biol* 315 (1), 42–54.
- Paulsen, J., Knutsen, H., Olstorn, H., Loberg, E., & Alexander, J. (2006). Identification of flat dysplastic aberrant crypt foci in the colon of azoxymethane-treated a/j mice. *Int J Cancer* 118 (3), 540–6.
- Paulsen, J., Steffensen, I., Loberg, E., Husoy, T., Namork, E., & Alexander, J. (2001). Qualitative and quantitative relationship between dysplastic aberrant crypt foci and tumorigenesis in the *min/+* mouse colon. *Cancer Res* 61 (13), 5010–5.
- Pearson, C. G. & Bloom, K. (2004). Dynamic microtubules lead the way for spindle positioning. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5 (6), 481–92.
- Pecreaux, J., Roper, J., Kruse, K., Julicher, F., Hyman, A., Grill, S., & Howard, J. (2006). Spindle oscillations during asymmetric cell division require a threshold number of active cortical force generators. *Curr Biol* 16 (21), 2111–22.
- Pepperkok, R. & Ellenberg, J. (2006). High-throughput fluorescence microscopy for systems biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7 (9), 690–6.
- Peris, L., Thery, M., Fauré, J., Saoudi, Y., Lafanechère, L., Chilton, J. K., Gordon-Weeks, P., Galjart, N., Bornens, M., Wordeman, L., Wehland, J., Andrieux, A., & Job, D. (2006). Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of cap-gly proteins at microtubule plus ends. *J Cell Biol* 174 (6), 839–49.
- Piehl, M. & Cassimeris, L. (2003). Organization and dynamics of growing microtubule plus ends during early mitosis. *Mol Biol Cell* 14 (3), 916–25.
- Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H., & Clevers, H. (2003). Canonical wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev* 17 (14), 1709–13.
- Ponder, B. & Wilkinson, M. (1986). Direct examination of the clonality of carcinogen-induced colonic epithelial dysplasia in chimeric mice. *J Natl Cancer Inst* 77 (4), 967–76.
- Potten, C., Booth, C., Tudor, G., Booth, D., Brady, G., Hurley, P., Ashton, G., Clarke, R., Sakakibara, S., & Okano, H. (2003). Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; *musashi-1*. *Differentiation* 71 (1), 28–41.
- Potten, C. S. (1977). Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to x and gamma irradiation. *Nature* 269 (5628), 518–21.
- Potten, C. S., Owen, G., & Booth, D. (2002). Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template dna strands. *J Cell Sci* 115 (Pt 11), 2381–8.
- Preston, S., Leedham, S., Oukrif, D., Deheregoda, M., Goodlad, R., Poulson, R., Alison, M., Wright, N., & Novelli, M. (2007). The development of duodenal microadenomas in *fap* patients : the human correlate of the *min* mouse. *J Pathol* 214 (3), 294–301.
- Preston, S. L., Wong, W.-M., Chan, A. O.-O., Poulson, R., Jeffery, R., Goodlad, R. A., Mandir, N., Elia, G., Novelli, M., Bodmer, W. F., Tomlinson, I. P., & Wright, N. A. (2003). Bottom-up histogenesis of colorectal adenomas : origin in the monocryptal adenoma and initial expansion by crypt fission. *Cancer Res* 63 (13), 3819–25.

- Pretlow, T., Barrow, B., Ashton, W., O’Riordan, M., Pretlow, T., Jurcisek, J., & Stellato, T. (1991). Aberrant crypts : putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res* 51 (5), 1564–7.
- Pretlow, T. & Bird, R. (2001). Correspondence re : Y. Yamada et al., frequent beta-catenin gene mutations and accumulations of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis. *cancer res.*, 60 : 3323–3327, 2000 ; and sequential analysis of morphological and biological properties of beta-catenin-accumulated crypts, provable premalignant lesions independent of aberrant crypt foci in rat colon carcinogenesis. *cancer res.*, 61 : 1874–1878, 2001. *Cancer Res* 61 (20), 7699–701.
- Pretlow, T., Edelmann, W., Kucherlapati, R., Pretlow, T., & Augenlicht, L. (2003). Spontaneous aberrant crypt foci in *apc1638n* mice with a mutant *apc* allele. *Am J Pathol* 163 (5), 1757–63.
- Pujana, M. A., Han, J.-D. J., Starita, L. M., Stevens, K. N., Tewari, M., Ahn, J. S., Rennert, G., Moreno, V., Kirchhoff, T., Gold, B., Assmann, V., Elshamy, W. M., Rual, J.-F., Levine, D., Rozek, L. S., Gelman, R. S., Gunsalus, K. C., Greenberg, R. A., Sobhian, B., Bertin, N., Venkatesan, K., Ayivi-Guedehoussou, N., Solé, X., Hernández, P., Lázaro, C., Nathanson, K. L., Weber, B. L., Cusick, M. E., Hill, D. E., Offit, K., Livingston, D. M., Gruber, S. B., Parvin, J. D., & Vidal, M. (2007). Network modeling links breast cancer susceptibility and centrosome dysfunction. *Nat Genet* 39 (11), 1338–49.
- Radtke, F. & Clevers, H. (2005). Self-renewal and cancer of the gut : two sides of a coin. *Science* 307 (5717), 1904–09.
- Rappaport, R. (1986). Establishment of the mechanism of cytokinesis in animal cells. *Int Rev Cytol* 105, 245–81.
- Rappaport, R. (1997). Cleavage furrow establishment by the moving mitotic apparatus. *Dev Growth Differ* 39 (2), 221–6.
- Ratineau, C., Duluc, I., Pourroyron, C., Kedinger, M., Freund, J.-N., & Roche, C. (2003). Endoderm- and mesenchyme-dependent commitment of the differentiated epithelial cell types in the developing intestine of rat. *Differentiation* 71 (2), 163–9.
- Rebollo, E., Sampaio, P., Januschke, J., Llamazares, S., Varmark, H., & González, C. (2007). Functionally unequal centrosomes drive spindle orientation in asymmetrically dividing *Drosophila* neural stem cells. *Dev Cell* 12 (3), 467–74.
- Reilein, A. & Nelson, W. (2005). *Apc* is a component of an organizing template for cortical microtubule networks. *Nat Cell Biol* 7 (5), 463–73.
- Reinsch, S. & Karsenti, E. (1994). Orientation of spindle axis and distribution of plasma membrane proteins during cell division in polarized *mdckii* cells. *J Cell Biol* 126 (6), 1509–26.
- Ricci-Vitiani, L., Pagliuca, A., Palio, E., Zeuner, A., & Maria, R. D. (2008). Colon cancer stem cells. *Gut* 57 (4), 538–48.

- Roberts, D., Slep, K., & Peifer, M. (2007). It takes more than two to tango : Dishevelled polymerization and wnt signaling. *Nat Struct Mol Biol* 14 (6), 463–65.
- Roegiers, F., Younger-Shepherd, S., Jan, L., & Jan, Y. (2001a). Two types of asymmetric divisions in the drosophila sensory organ precursor cell lineage. *Nat Cell Biol* 3 (1), 58–67.
- Roegiers, F., Younger-Shepherd, S., Jan, L., & Jan, Y. (2001b). Bazooka is required for localization of determinants and controlling proliferation in the sensory organ precursor cell lineage in drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (25), 14469–74.
- Rogers, S. L., Rogers, G. C., Sharp, D. J., & Vale, R. D. (2002). Drosophila eb1 is important for proper assembly, dynamics, and positioning of the mitotic spindle. *J Cell Biol* 158 (5), 873–84.
- Roncucci, L., Pedroni, M., Vaccina, F., Benatti, P., Marzona, L., & Pol, A. (2000). Aberrant crypt foci in colorectal carcinogenesis. cell and crypt dynamics. *Cell Prolif* 33 (1), 1–18.
- Rosin-Arbesfeld, R., Ihrke, G., & Bienz, M. (2001). Actin-dependent membrane association of the apc tumour suppressor in polarized mammalian epithelial cells. *Embo J* 20 (21), 5929–39.
- Rosin-Arbesfeld, R., Townsley, F., & Bienz, M. (2000). The apc tumour suppressor has a nuclear export function. *Nature* 406 (6799), 1009–12.
- Rowan, A., Lamlum, H., Ilyas, M., Wheeler, J., Straub, J., Papadopoulou, A., Bicknell, D., Bodmer, W., & Tomlinson, I. (2000). Apc mutations in sporadic colorectal tumors : A mutational "hotspot" and interdependence of the "two hits". *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (7), 3352–7.
- Roychowdhury, S., Panda, D., Wilson, L., & Rasenick, M. M. (1999). G protein alpha subunits activate tubulin gtpase and modulate microtubule polymerization dynamics. *J Biol Chem* 274 (19), 13485–90.
- Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Muller, O., Chamberlain, S., Masiarz, F., Munemitsu, S., & Polakis, P. (1993). Association of the apc gene product with beta-catenin. *Science* 262 (5140), 1731–4.
- Rusan, N. M. & Peifer, M. (2007). A role for a novel centrosome cycle in asymmetric cell division. *J Cell Biol* 177 (1), 13–20.
- Rusan, N. M. & Peifer, M. (2008). Original cin : reviewing roles for apc in chromosome instability. *J Cell Biol* 181 (5), 719–26.
- Saburi, S., Hester, I., Fischer, E., Pontoglio, M., Eremina, V., Gessler, M., Quaggin, S. E., Harrison, R., Mount, R., & McNeill, H. (2008). Loss of fat4 disrupts pcp signaling and oriented cell division and leads to cystic kidney disease. *Nat Genet* 40 (8), 1010–5.
- Samowitz, W. S., Curtin, K., Wolff, R. K., Albertsen, H., Sweeney, C., Caan, B. J., Ulrich, C. M., Potter, J. D., & Slattery, M. L. (2008). The mlh1 -93 g>a promoter polymorphism and genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 47 (10), 835–44.

- Sansom, O., Reed, K., Hayes, A., Ireland, H., Brinkmann, H., Newton, I., Batlle, E., Simon-Assmann, P., Clevers, H., Nathke, I., Clarke, A., & Winton, D. (2004). Loss of *apc* in vivo immediately perturbs wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev* 18 (12), 1385–90.
- Schaefer, M., Petronczki, M., Dorner, D., Forte, M., & Knoblich, J. (2001). Heterotrimeric g proteins direct two modes of asymmetric cell division in the drosophila nervous system. *Cell* 107 (2), 183–94.
- Schaefer, M., Shevchenko, A., & Knoblich, J. (2000). A protein complex containing inscuteable and the galpha-binding protein pins orients asymmetric cell divisions in drosophila. *Curr Biol* 10 (7), 353–62.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., & Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary dna microarray. *Science* 270 (5235), 467–70.
- Schlessinger, K., McManus, E. J., & Hall, A. (2007). Cdc42 and noncanonical wnt signal transduction pathways cooperate to promote cell polarity. *J Cell Biol* 178 (3), 355–61.
- Schroer, T. (2004). Dynactin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 759–79.
- Schultz, N. & Onfelt, A. (2001). Spindle positioning in fibroblasts supports an astral microtubule length dependent force generation at the basal membrane. *Cell Motil Cytoskeleton* 50 (2), 69–88.
- Schwarz-Romond, T., Fiedler, M., Shibata, N., Butler, P., Kikuchi, A., Higuchi, Y., & Bienz, M. (2007). The dix domain of dishevelled confers wnt signaling by dynamic polymerization. *Nat Struct Mol Biol* 14 (6), 484–92.
- Scoville, D., Sato, T., He, X., & Li, L. (2008). Current view : intestinal stem cells and signaling. *Gastroenterology* 134 (3), 849–64.
- Segalen, M., David, N., & Bellaïche, Y. (2006). [the heterotrimeric g proteins during asymmetric cell division in drosophila]. *Med Sci (Paris)* 22 (3), 243–6.
- Sharma, M., Leung, L., Brocardo, M., Henderson, J., Flegg, C., & Henderson, B. R. (2006). Membrane localization of adenomatous polyposis coli protein at cellular protrusions : targeting sequences and regulation by beta-catenin. *J Biol Chem* 281 (25), 17140–9.
- Siderovski, D., Diverse-Pierluissi, M., & De Vries, L. (1999). The goloco motif : a galphai/o binding motif and potential guanine-nucleotide exchange factor. *Trends Biochem Sci* 24 (9), 340–1.
- Siegrist, S. & Doe, C. (2005). Microtubule-induced pins/galphai cortical polarity in drosophila neuroblasts. *Cell* 123 (7), 1323–35.
- Siegrist, S. E. & Doe, C. Q. (2006). Extrinsic cues orient the cell division axis in drosophila embryonic neuroblasts. *Development* 133 (3), 529–36.
- Siegrist, S. E. & Doe, C. Q. (2007). Microtubule-induced cortical cell polarity. *Genes Dev* 21 (5), 483–96.

- Siller, K., Cabernard, C., & Doe, C. (2006). The numa-related nud protein binds pins and regulates spindle orientation in drosophila neuroblasts. *Nat Cell Biol* 8 (6), 594–600.
- Siller, K. & Doe, C. (2008). Lis1/dynaactin regulates metaphase spindle orientation in drosophila neuroblasts. *Dev Biol* 319 (1), 1–9.
- Simon-Assmann, P. & Kedinger, M. (1993). Heterotypic cellular cooperation in gut morphogenesis and differentiation. *Semin Cell Biol* 4 (3), 221–30.
- Simons, K. & van Meer, G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27 (17), 6197–202.
- Slattery, M. L., Curtin, K., Ma, K., Edwards, S., Schaffer, D., Anderson, K., & Samowitz, W. (2002). Diet activity, and lifestyle associations with p53 mutations in colon tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11 (6), 541–8.
- Smith, G., Carey, F. A., Beattie, J., Wilkie, M. J. V., Lightfoot, T. J., Coxhead, J., Garner, R. C., Steele, R. J. C., & Wolf, C. R. (2002). Mutations in *apc*, *kirsten-ras*, and *p53*—alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (14), 9433–8.
- Smith, G. H. (2005). Label-retaining epithelial cells in mouse mammary gland divide asymmetrically and retain their template dna strands. *Development* 132 (4), 681–7.
- Smits, R., Kielman, M. F., Breukel, C., Zurcher, C., Neufeld, K., Jagmohan-Changur, S., Hoffand, N., van Dijk, J., White, R., Edelmann, W., Kucherlapati, R., Khan, P. M., & Fodde, R. (1999). *Apc1638t* : a mouse model delineating critical domains of the adenomatous polyposis coli protein involved in tumorigenesis and development. *Genes Dev* 13 (10), 1309–21.
- Smits, R., van der Houven van Oordt, W., Luz, A., Zurcher, C., Jagmohan-Changur, S., Breukel, C., Khan, P. M., & Fodde, R. (1998). *Apc1638n* : a mouse model for familial adenomatous polyposis-associated desmoid tumors and cutaneous cysts. *Gastroenterology* 114 (2), 275–83.
- Srinivasan, D., Fisk, R., Xu, H., & Heuvel, S. (2003). A complex of *lin-5* and *gpr* proteins regulates g protein signaling and spindle function in *c elegans*. *Genes Dev* 17 (10), 1225–39.
- Strutt, D. (2005). Organ shape : controlling oriented cell division. *Curr Biol* 15 (18), R758–R759.
- Su, L. K., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Preisinger, A. C., Moser, A. R., Luongo, C., Gould, K. A., & Dove, W. F. (1992). Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the *apc* gene. *Science* 256 (5057), 668–70.
- Su, L. K., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1993). Association of the *apc* tumor suppressor protein with catenins. *Science* 262 (5140), 1734–7.
- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G., & Thomson, J. N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 100 (1), 64–119.

- Takayama, T., Ohi, M., Hayashi, T., Miyanishi, K., Nobuoka, A., Nakajima, T., Satoh, T., Takimoto, R., Kato, J., Sakamaki, S., & Niitsu, Y. (2001). Analysis of k-ras, apc, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 121 (3), 599–611.
- Takizawa, S., Nagasaka, K., Nakagawa, S., Yano, T., Nakagawa, K., Yasugi, T., Takeuchi, T., Kanda, T., Huibregtse, J. M., Akiyama, T., & Taketani, Y. (2006). Human scribble, a novel tumor suppressor identified as a target of high-risk hpv e6 for ubiquitin-mediated degradation, interacts with adenomatous polyposis coli. *Genes Cells* 11 (4), 453–64.
- Tall, G. & Gilman, A. (2005). Resistance to inhibitors of cholinesterase 8a catalyzes release of galphai-gtp and nuclear mitotic apparatus protein (numa) from numa/lgn/galphai-gdp complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (46), 16584–9.
- Tall, G., Krumins, A., & Gilman, A. (2003). Mammalian ric-8a (synembryn) is a heterotrimeric galpha protein guanine nucleotide exchange factor. *J Biol Chem* 278 (10), 8356–62.
- Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Hata, K., Sugie, S., Niho, N., Sakano, K., Takahashi, M., & Wakabayashi, K. (2006). Dextran sodium sulfate strongly promotes colorectal carcinogenesis in apc(min/+) mice : inflammatory stimuli by dextran sodium sulfate results in development of multiple colonic neoplasms. *Int J Cancer* 118 (1), 25–34.
- Tanenbaum, M. E., Galjart, N., van Vugt, M. A. T. M., & Medema, R. H. (2006). Clip-170 facilitates the formation of kinetochore-microtubule attachments. *EMBO J* 25 (1), 45–57.
- Thery, M. & Bornens, M. (2007). [cell adhesion guides cell polarity.]. *Med Sci (Paris)* 23 (3), 230–2.
- Thery, M., Racine, V., Pepin, A., Piel, M., Chen, Y., Sibarita, J., & Bornens, M. (2005). The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nat Cell Biol* 7 (10), 947–53.
- Thery, M., Racine, V., Piel, M., Pepin, A., Dimitrov, A., Chen, Y., Sibarita, J., & Bornens, M. (2006). Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (52), 19771–6.
- Tighe, A., Johnson, V., Albertella, M., & Taylor, S. (2001). Aneuploid colon cancer cells have a robust spindle checkpoint. *EMBO Rep* 2 (7), 609–14.
- Tighe, A., Johnson, V., & Taylor, S. (2004). Truncating apc mutations have dominant effects on proliferation, spindle checkpoint control, survival and chromosome stability. *J Cell Sci* 117 (Pt 26), 6339–53.
- Toyoshima, F., Matsumura, S., Morimoto, H., Mitsushima, M., & Nishida, E. (2007). Ptdins(3,4,5)p3 regulates spindle orientation in adherent cells. *Dev Cell* 13 (6), 796–811.
- Toyoshima, F. & Nishida, E. (2007a). Integrin-mediated adhesion orients the spindle parallel to the substratum in an eb1- and myosin x-dependent manner. *Embo J* 26 (6), 1487–98.

- Toyoshima, F. & Nishida, E. (2007b). Spindle orientation in animal cell mitosis : roles of integrin in the control of spindle axis. *J Cell Physiol* 213 (2), 407–11.
- Tsai, M.-C. & Ahringer, J. (2007). Microtubules are involved in anterior-posterior axis formation in *c. elegans* embryos. *J Cell Biol* 179 (3), 397–402.
- Tsou, M., Hayashi, A., & Rose, L. (2003). Let-99 opposes galpha/gpr signaling to generate asymmetry for spindle positioning in response to par and mes-1/src-1 signaling. *Development* 130 (23), 5717–30.
- Tsushimi, T., Noshima, S., Oga, A., Esato, K., & Sasaki, K. (2001). Dna amplification and chromosomal translocations are accompanied by chromosomal instability : analysis of seven human colon cancer cell lines by comparative genomic hybridization and spectral karyotyping. *Cancer Genet Cytogenet* 126 (1), 34–38.
- Vaisberg, E. A., Koonce, M. P., & McIntosh, J. R. (1993). Cytoplasmic dynein plays a role in mammalian mitotic spindle formation. *J Cell Biol* 123 (4), 849–58e.
- van Es, J. H., Kirkpatrick, C., van de Wetering, M., Molenaar, M., Miles, A., Kuipers, J., Destrée, O., Peifer, M., & Clevers, H. (1999). Identification of *apc2*, a homologue of the adenomatous polyposis coli tumour suppressor. *Curr Biol* 9 (2), 105–8.
- van Meer, G. & Simons, K. (1988). Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *J Cell Biochem* 36 (1), 51–8.
- Vasiliev, J. M., Omelchenko, T., Gelfand, I. M., Feder, H. H., & Bonder, E. M. (2004). Rho overexpression leads to mitosis-associated detachment of cells from epithelial sheets : a link to the mechanism of cancer dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (34), 12526–30.
- Vinson, C. R. & Adler, P. N. (1987). Directional non-cell autonomy and the transmission of polarity information by the frizzled gene of drosophila. *Nature* 329 (6139), 549–51.
- Waghmare, S. K., Bansal, R., Lee, J., Zhang, Y. V., McDermitt, D. J., & Tumber, T. (2008). Quantitative proliferation dynamics and random chromosome segregation of hair follicle stem cells. *EMBO J* 27 (9), 1309–20.
- Wang, H., Ng, K., Qian, H., Siderovski, D., Chia, W., & Yu, F. (2005). Ric-8 controls drosophila neural progenitor asymmetric division by regulating heterotrimeric g proteins. *Nat Cell Biol* 7 (11), 1091–8.
- Wang, Y. & Nathans, J. (2007). Tissue/planar cell polarity in vertebrates : new insights and new questions. *Development* 134 (4), 647–58.
- Wasan, H., Park, H., Liu, K., Mandir, N., Winnett, A., Sasieni, P., Bodmer, W., Goodlad, R., & Wright, N. (1998). *Apc* in the regulation of intestinal crypt fission. *J Pathol* 185 (3), 246–55.
- Watanabe, T., Wang, S., Noritake, J., Sato, K., Fukata, M., Takefuji, M., Nakagawa, M., Izumi, N., Akiyama, T., & Kaibuchi, K. (2004). Interaction with *iqgap1* links *apc* to *rac1*, *cdc42*, and actin filaments during cell polarization and migration. *Dev Cell* 7 (6), 871–83.

- Watson, P. & Stephens, D. J. (2006). Microtubule plus-end loading of p150(glued) is mediated by eb1 and clip-170 but is not required for intracellular membrane traffic in mammalian cells. *J Cell Sci* 119 (Pt 13), 2758–67.
- Willard, F., Kimple, R., & Siderovski, D. (2004). Return of the gdi : the goloco motif in cell division. *Annu Rev Biochem* 73, 925–51.
- Wodarz, A. & Huttner, W. B. (2003). Asymmetric cell division during neurogenesis in drosophila and vertebrates. *Mech Dev* 120 (11), 1297–1309.
- Wong, M., Rubinfeld, B., & Gordon, J. (1998). Effects of forced expression of an nh2-terminal truncated beta-catenin on mouse intestinal epithelial homeostasis. *J Cell Biol* 141 (3), 765–77.
- Wright, N. A. & Irwin, M. (1982). The kinetics of villus cell populations in the mouse small intestine. i. normal villi : the steady state requirement. *Cell Tissue Kinet* 15 (6), 595–609.
- Yamada, Y., Hata, K., Hirose, Y., Hara, A., Sugie, S., Kuno, T., Yoshimi, N., Tanaka, T., & Mori, H. (2002). Microadenomatous lesions involving loss of apc heterozygosity in the colon of adult apc(min/+) mice. *Cancer Res* 62 (22), 6367–70.
- Yamada, Y. & Mori, H. (2003). Pre-cancerous lesions for colorectal cancers in rodents : a new concept. *Carcinogenesis* 24 (6), 1015–9.
- Yamada, Y., Yoshimi, N., Hirose, Y., Matsunaga, K., Katayama, M., Sakata, K., Shimizu, M., Kuno, T., & Mori, H. (2001). Sequential analysis of morphological and biological properties of beta-catenin-accumulated crypts, provable premalignant lesions independent of aberrant crypt foci in rat colon carcinogenesis. *Cancer Res* 61 (5), 1874–8.
- Yamashita, Y. M., Jones, D. L., & Fuller, M. T. (2003). Orientation of asymmetric stem cell division by the apc tumor suppressor and centrosome. *Science* 301 (5639), 1547–50.
- Yamashita, Y. M., Mahowald, A. P., Perlin, J. R., & Fuller, M. T. (2007). Asymmetric inheritance of mother versus daughter centrosome in stem cell division. *Science* 315 (5811), 518–21.
- Yoder, B. K., Hou, X., & Guay-Woodford, L. M. (2002). The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol* 13 (10), 2508–16.
- Yu, F., Morin, X., Kaushik, R., Bahri, S., Yang, X., & Chia, W. (2003). A mouse homologue of drosophila pins can asymmetrically localize and substitute for pins function in drosophila neuroblasts. *J Cell Sci* 116, 887–96.
- Yu, F., Ong, C., Chia, W., & Yang, X. (2002). Membrane targeting and asymmetric localization of drosophila partner of inscuteable are discrete steps controlled by distinct regions of the protein. *Mol Cell Biol* 22 (12), 4230–40.
- Zhang, H., Skop, A., & White, J. (2008). Src and wnt signaling regulate dynactin accumulation to the p2-ems cell border in *c. elegans* embryos. *J Cell Sci* 121 (Pt 2), 155–61.

Zhong, W. & Chia, W. (2008). Neurogenesis and asymmetric cell division. *Curr Opin Neurobiol* 18 (1), 4–11.

## Résumé

L'homéostasie de l'épithélium de la muqueuse colique est régie par un ensemble de voies de signalisation, au rang desquelles la voie Wnt. Le gène suppresseur de tumeur Apc (Adenomatous Polyposis Coli) joue un rôle majeur dans la régulation de la voie Wnt. Des mutations germinales hétérozygotes prédisposent fortement au cancer du côlon, et les premières structures aberrantes visibles à l'échelle tissulaire, ACF (Aberrant Crypt Foci), apparaissent suite à la perte de l'allèle sauvage. Ainsi un des premiers signes de la perte d'APC est une modification morphologique de la crypte. Pour autant, pratiquement rien n'est connu sur la morphogenèse de ce tissu à l'âge adulte, en particulier quel est le rôle des divisions orientées dans ce processus, et l'implication potentielle des mutations dans Apc dans ces mécanismes. Nous avons développé une technique d'observation de cryptes entières fixées et intactes pour la mesure d'orientation des fuseaux mitotiques avec l'axe long de la crypte. Nos résultats montrent qu'il existe une orientation préférentielle, avec 80% des fuseaux mitotiques formant un angle de moins de 30° avec l'axe de la crypte. La perte totale d'APC perturbe profondément cette orientation, et est corrélée à une augmentation du diamètre de la crypte. Une mutation hétérozygote dans Apc n'a pas d'effet sur l'orientation, et une seconde mutation (situation rencontrée dans les ACF) est nécessaire pour perturber l'orientation. Ces données démontrent l'existence d'une division orientée, ce qui suppose un mécanisme général d'établissement de la polarité à l'échelle tissulaire, la polarité planaire. Nous nous sommes ensuite attaché à comprendre le rôle d'APC dans la polarité apico-basale et dans la régulation des générateurs de force impliqués dans l'orientation du fuseau. Nous avons utilisé un modèle cellulaire de gain de fonction pour la protéine APC, composé des lignées SW480 (qui n'expriment que la protéine tronquée) et SW480-APC qui exprime en plus la protéine entière. L'expression d'APC induit un renforcement de la polarité apico-basale dans les cellules SW480-APC, et modifie le comportement du fuseau. J'ai développé un programme d'analyse du comportement du fuseau pour quantifier ces modifications, basé sur l'analyse d'un grand nombre d'évènements. L'expression d'APC entraîne une augmentation de la dynamique du fuseau, des réorientations, et des déplacements du fuseau loin du centroïde de la cellule. APC joue donc potentiellement dans la polarité apico-basale et ainsi dans le contrôle de l'orientation du fuseau.

## Summary

Colonic epithelium homeostasis rely on signaling pathways among wich the Wnt pathway. Heterozygous germ cell mutations of the Apc tumour suppressor gene are highly penetrant in predisposing to colorectal cancer. Loss of Heterozygosity (LOH) at the Apc locus is believed to initiate the tumourigenic pathway, typically with the appearance of potentially pre-cancerous lesions: Aberrant Crypt Foci (ACF). Little is known about the morphogenesis of this tissue in adult, in particular what is the role of oriented cell division in this mechanism, and if an Apc mutation could affect those mechanisms. We have developed a technique to isolate and observe intact entire fixed crypts. Our data indicates that there is a preferential axis of orientation, with 80% of cells being oriented with less than 30° along the crypt axis. Total loss of APC triggers profound perturbation of orientation, correlated with crypt width increase. A single mutation has no effect, and a second mutation is needed to perturb cell orientation. We then analysed the effect of Apc on apico-basal polarity and force generators regulation using a gain of function for Apc. This model composed of SW480 expressing a truncated fragment and SW480-APC expressing full length APC allow us to demonstrate reinforcement of apico-basal polarity, and spindle behavior changes. Our data show that APC expression triggers an increase of spindle dynamic, with spindle undergoing more reorientation and more displacements. APC could play a role in apico-basal cell polarity and hence in spindle orientation.