



HAL
open science

Instabilité chimique dans les solutions microtubulaires : étude et recherche d'effecteurs

Nicolas Caudron

► **To cite this version:**

Nicolas Caudron. Instabilité chimique dans les solutions microtubulaires : étude et recherche d'effecteurs. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2001. Français. NNT : . tel-00078986

HAL Id: tel-00078986

<https://theses.hal.science/tel-00078986>

Submitted on 8 Jun 2006

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

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

THESE

présentée par

Nicolas CAUDRON

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I

(arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 30 mars 1992)

Spécialité Biologie

Instabilité chimique dans les solutions microtubulaires : étude et recherche d'effecteurs

soutenue le 17 septembre 2001 devant la commission d'examen composée de :

Mme Eva PEBAY-PEYROULA

Présidente

M. Jean-Renaud GAREL

Rapporteur

M André PICARD

Rapporteur

M. Michel Bornens

Examineur

M. Didier JOB

Directeur de thèse

Thèse réalisée au sein de l'école doctorale de chimie et sciences du vivant
préparée au laboratoire du cytosquelette INSERM U366
Département de Biologie Moléculaire et Structurale
CEA-Grenoble, France

Remerciements

Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé au sein du laboratoire du cytosquelette INSERM U366 au CEA Grenoble, dirigé par Didier JOB. Je tiens à le remercier pour m'avoir accueilli et encadré. Sa disponibilité et ses conseils m'ont permis de mener à bien ces années au laboratoire.

Je tiens à remercier aussi Odile Valiron, qui a encadré ma thèse avec beaucoup d'enthousiasme, et avec qui les relations ont permis une collaboration extrêmement profitable. Sans sa présence, sa gentillesse et son savoir faire, ce travail n'aurait pu aboutir.

J'exprime ma gratitude à Madame Eva Pebay-Peyroula d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse. Je remercie également MM. Jean-Renaud Garel et André Picard pour le temps accordé à l'évaluation et à la critique de ces travaux, ainsi que M. Michel Bornens pour avoir accepté de juger cette thèse.

Un immense merci à tous les membres du laboratoire pour leur bonne humeur de tous les jours, leurs compétences, les barbecues aux Vouillands et autres pots mémorables. Partager le quotidien des STOPeurs fous et autres acharnés du microbidule est une expérience salutaire...

Un merci tout spécial à Stéphanie qui n'ignore plus rien des catastrophes et extraits de cerveaux de bœuf, et qui a partagé les bons et les mauvais moments de cette thèse.

Liste des principales abréviations

ATP, ADP :	Adénosine tri-phosphate, di-phosphate
Da, kDa :	Dalton, kiloDalton
DTT :	Di-Thio-Thréithiol
EGS :	Ethylèneglycol-bis(succinimidylsuccinate)
EGTA :	Ethylèneglycol-tri-éthylamine
GMP, GDP, GTP :	Guanosine mono-phosphate, di-phosphate, tri-phosphate
γ -TURC :	<i>γ-tubulin-containing ring complex</i>
HPLC :	<i>High performance liquid chromatography</i>
MAP :	<i>Microtubule associated protein</i>
SDS :	Sodium-dodécyl-sulfate
TTL :	Tubuline tyrosine ligase

SOMMAIRE

I INTRODUCTION	1
I.1 LE CYTOSQUELETTE	1
I.2 LE CYTOSQUELETTE MICROTUBULAIRE	1
I.3 L'ASSEMBLAGE DES MICROTUBULES IN VITRO	7
I.4 LA DYNAMIQUE D'ASSEMBLAGE DES MICROTUBULES <i>IN VIVO</i>	18
I.5 LE CONTRÔLE DE LA DYNAMIQUE D'ASSEMBLAGE DES MICROTUBULES	22
I.6 OBJECTIFS DE CETTE ÉTUDE	28
II MATÉRIELS ET MÉTHODES	31
II.1 PURIFICATION DE LA TUBULINE	31
II.2 TEST DE LA PC-TUBULINE.	32
II.3 FILTRATION SUR BIOGEL	33
II.4 PRÉPARATION DE TUBULINE-GTP	33
II.5 PRÉPARATION DE TUBULINE-GDP	34
II.6 ASSEMBLAGE DES MICROTUBULES À PARTIR DE TUBULINE-GTP	34
II.7 ANALYSE DE L'ACTIVITÉ NUCLÉOTIDE DIPHOSPHATE KINASE	36
II.8 ELECTROPHORÈSE DE PROTÉINES EN CONDITIONS DÉNATURANTES (SDS-PAGE)	37
II.9 ELECTROTRANSFERT	38
II.10 DÉTECTION IMMUNOLOGIQUE DES PROTÉINES TRANSFÉRÉES SUR MEMBRANE DE NITROCELLULOSE	39
II.11 TYROSINATION DE LA TUBULINE	39
II.12 PURIFICATION DE PARTENAIRES DE LA TUBULINE PAR COLONNE D'AFFINITÉ	40
II.13 PHOSPHORYLATION DES PARTENAIRES DE LA TUBULINE PAR CDC2	43
II.14 ÉTABLISSEMENT DE CARTES PEPTIDIQUES PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE	43
II.15 PRÉPARATION ET CARACTÉRISATION D'OLIGOMÈRES PONTÉS COVALEMENT DE TUBULINE	44
III RÉÉVALUATION DES FACTEURS CONTRÔLANT LA DYNAMIQUE D'ASSEMBLAGE DES MICROTUBULES	51
III.1 RÉSULTATS	51
III.2 DISCUSSION	71

<u>IV OBTENTION ET CARACTÉRISATION D'OLIGOMÈRES DE TUBULINE STIMULANT LA NUCLÉATION DES MICROTUBULES</u>	75
IV.1 OBTENTION D'OLIGOMÈRES DE TUBULINE STIMULANT LA NUCLÉATION	75
IV.2 CARACTÉRISATION DES AMORCES DE NUCLÉATION	78
IV.3 EXPOSANT DE NUCLÉATION	84
IV.4 DÉSASSEMBLAGE	88
IV.5 DISCUSSION	88
<u>V IDENTIFICATION DE PARTENAIRES DE LA TUBULINE</u>	95
V.1 PRINCIPE DE LA TECHNIQUE	96
V.2 RÉSULTATS	97
V.3 DISCUSSION	104
V.4 CONCLUSION	111
<u>VI CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u>	113
<u>ANNEXE 1 : COMPOSITION DES TAMPONS.</u>	117
<u>ANNEXE 2 : DILUTION DES ANTICORPS</u>	121
<u>ANNEXE 3 : SATURATION EN SULFATE D'AMMONIUM</u>	123
<u>ANNEXE 4 : ARTICLE PARU DANS LE <i>JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY</i></u>	125
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	137

Chapitre I : Introduction

I Introduction

I.1 Le cytosquelette

L'organisation des nombreux composants des cellules eucaryotes dépend du cytosquelette : un ensemble de réseaux de filaments protéiques intriqués qui s'étend dans le cytoplasme. Ce réseau participe au soutien des cellules, surtout dans les cellules animales qui n'ont pas de paroi cellulaire.

Contrairement à ce que son nom laisserait penser, le cytosquelette est une structure hautement dynamique. Le cytosquelette est perpétuellement réorganisé, en même temps que la cellule change de forme ou se divise. De plus, le cytosquelette participe également à une grande diversité de mouvements des cellules : changements de forme des cellules, migration de cellules sur une surface, déplacement des spermatozoïdes, contraction des cellules musculaires.

A l'intérieur des cellules, le cytosquelette assure le positionnement et le déplacement des organites intracellulaires : positionnement de l'appareil de Golgi ou encore déplacement des chromosomes lors de la division cellulaire (Alberts *et al.*, 2000).

Dans l'histoire de la vie, l'apparition du cytosquelette a été une étape cruciale. Le cytosquelette est en effet absent chez les procaryotes, dont l'espace intracellulaire restreint n'est pas compartimenté comme chez les eucaryotes. Le cytosquelette serait apparu comme un élément structurant et comme une machinerie de séparation du matériel génétique lors de la division cellulaire (Cavalier-Smith, 1987).

On distingue trois grands types de constituants du cytosquelette, d'après leurs diamètres en microscopie électronique. Les plus petits sont les microfilaments d'actine (7 nm de diamètre). Ce sont des polymères hélicoïdaux d'une protéine globulaire. Ils participent entre autres à la contraction musculaire. Les filaments intermédiaires (≈ 10 nm de diamètre) sont constitués de protéines fibreuses. Ces protéines fibreuses sont diverses, variables selon les tissus. Dans les cellules épithéliales, elles assurent la résistance mécanique des cellules à l'étirement. Les microtubules enfin, sont des cylindres creux de 25 nm de diamètre constitués par l'assemblage hélicoïdal d'une protéine hétérodimérique, la tubuline (figure I-1). De nombreuses protéines sont associées aux microtubules, qui ont un rôle dans l'assemblage des microtubules comme les protéines associées aux microtubules (MAP) ou servent de moteurs moléculaires comme la dynéine ou la kinésine (Alberts *et al.*, 2000).

I.2 Le cytosquelette microtubulaire

Nous examinerons les propriétés de la tubuline, brique élémentaire des microtubules, puis les propriétés des microtubules. Dans un second temps nous présenterons les modalités

de l'assemblage des microtubules *in vitro*, et enfin nous examinerons comment les cellules exploitent les propriétés du cytosquelette microtubulaire *in vivo*.

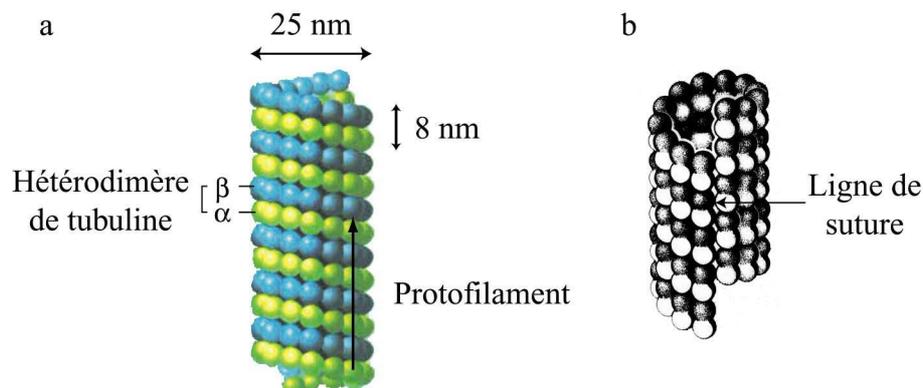


Figure I-1: Structure des microtubules. (a) Représentation schématique d'un microtubule et de l'arrangement des dimères de tubuline (d'après Dustin, 1984). (b) Ligne de suture. Les microtubules à 13 protofilaments présentent une irrégularité de l'arrangement des dimères de tubuline appelée ligne de suture (voir texte, d'après Mandelkow et Mandelkow, 1985).

I.2.1 La tubuline

On distingue actuellement sept tubulines différentes (pour une revue, voir Dutcher, 2001; Oakley, 2000). Les tubulines les mieux connues sont les tubulines α et β , qui forment un hétérodimère constituant les microtubules. La tubuline γ est impliquée dans les premières étapes de la formation des microtubules : la nucléation. Les tubulines δ , ϵ , ζ et η ont des fonctions encore mal établies. La tubuline δ est nécessaire à l'assemblage du flagelle chez l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*, et la tubuline η est indispensable à la duplication des corps basaux (analogues aux centrioles) chez la Paramécie. Les tubulines ϵ et ζ enfin n'ont pas de fonction connue et ont été détectées par recherche systématique dans les banques de données de séquences.

I.2.1.1 Génétique

Ce sont des gènes différents qui codent les deux sous-unités α et β de la tubuline. De plus, il existe plusieurs gènes codant les tubulines α et β , en nombre variable selon les espèces. Ces différents gènes ont une expression régulée au cours du développement. Ainsi chez l'oursin, lors du développement embryonnaire, 10 à 15 copies des gènes des sous-unités α et β sont exprimées à des moments différents du développement (Alexandraki et Ruderman, 1981).

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, 2 gènes codant la tubuline α (*TUB1* et *TUB3*) et 1 gène la tubuline β (*TUB2*) ont été identifiés. Les gènes *TUB1* et *TUB3* ne diffèrent

que de 10% en séquence d'acides aminés (Schatz *et al.*, 1986a). Le gène *TUB1* est essentiel, c'est à dire que sa délétion est létale. La délétion du gène *TUB3* en revanche gène n'entraîne pas de mortalité. Toutefois, les spores produites survivent très mal. C'est donc sans doute lors de cette phase du cycle de développement que le gène *TUB3* est le plus important. Toutefois, ces différences seraient liées surtout à des taux d'expression différents des deux gènes. Les auteurs ont d'ailleurs montré qu'en manipulant les niveaux d'expression de *TUB3* dans des levures mutantes pour *tub1*, l'expression de *TUB3* pouvait compenser la délétion du gène *Tub1* (Schatz *et al.*, 1986b).

Chez l'homme il existe au moins 8 gènes codant la sous-unité α , 5 codant la sous-unité β , 2 codant la tubuline γ . Toutefois, le séquençage complet du génome humain a révélé la présence de plusieurs autres gènes codant ces tubulines. Certaines isoformes de la tubuline α sont exprimées spécifiquement dans le cerveau, alors que d'autres sont ubiquitaires (Raff, 1994).

Certains gènes de tubuline ne sont pas interchangeable : chez la drosophile, le gène $\beta 2$ qui est exprimé dans les testicules est nécessaire à la formation de microtubules à 16 protofilaments caractéristiques du flagelle des spermatozoïdes (Raff *et al.*, 1997). Egalement, chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, les gènes *Mec7* et *Mec12* codent respectivement des isoformes de tubuline α et β qui forment spécifiquement des microtubules contenant 15 protofilaments. Ces microtubules à 15 protofilaments sont caractéristiques des neurones dans la mécanoréception chez ce nématode (Fukushige *et al.*, 1999; Savage *et al.*, 1994). Hormis dans quelques cas, la diversité des tubulines α et β a toutefois une signification fonctionnelle peu claire (Raff, 1994).

I.2.1.2 Synthèse de la tubuline

La synthèse de la tubuline est soumise à deux niveaux de contrôle : la régulation de la quantité de tubuline disponible dans la cellule, et le contrôle de la stœchiométrie entre les deux sous-unités.

La quantité de tubuline libre dans le cytosol des cellules est régulée. Ainsi des expériences de microinjection de tubuline purifiée dans des cellules ont montré que la quantité de tubuline non polymérisée influe la quantité d'ARNm de la tubuline (Cleveland et Havercroft, 1983). Des expériences avec des drogues anti-microtubulaires ont également été menées. Le traitement des cellules par des drogues dépolymérisant le cytosquelette microtubulaire (nocodazole, colchicine) stimulent l'expression de la tubuline. Le taxol inversement, qui favorise l'assemblage des microtubules entraîne une baisse de l'expression de la tubuline. (Cleveland et Havercroft, 1983). La quantité de tubuline disponible peut ainsi être ajustée en fonction de la configuration du cytosquelette microtubulaire (Cleveland, 1989).

De plus, l'expression des deux sous-unités est coordonnée. Un contrôle post-traductionnel existe, puisque le taux de dégradation de la tubuline β est augmenté lorsque le

nombre de copies du gène de la tubuline β est augmenté (Whitfield *et al.*, 1986). De plus, quand le gène de la tubuline β est surexprimé, l'expression du gène de la tubuline α est augmentée (Gonzales-Garay et Cabral, 1995). De cette manière, les cellules produisent autant de tubuline α que de tubuline β .

I.2.1.3 Formation de l'hétérodimère de tubuline

Les sous-unités nouvellement synthétisées sont prises en charges par des protéines chaperonnes. Dans un premier temps, chacune des sous-unités est repliée dans sa structure native grâce à la chaperonne c-cpn. La chaperonne c-cpn est un complexe multi-protéiques qui participe au repliement de nombreuses protéines cytosoliques chez les eucaryotes. Cette étape nécessite de l'ATP, du GTP et plusieurs facteurs protéiques (Gao *et al.*, 1993; Melki *et al.*, 1996). Pour la tubuline β , quatre cofacteurs spécifiques ont été identifiés (Tian *et al.*, 1996). La deuxième étape de la formation de l'hétérodimère est l'assemblage des deux sous-unités. Le lieu et les modalités de cette étape sont encore inconnus.

I.2.1.4 Biochimie

La tubuline est une protéine liant le GTP : chacune des sous-unités α et β lie une molécule de GTP. Chaque dimère lie donc deux molécules de GTP : l'une est non échangeable avec la solution et non hydrolysable en GDP, l'autre est échangeable avec la solution et hydrolysable en GDP (Yanagisawa *et al.*, 1968). Des expériences de pontages covalents du GTP induits par la lumière ont montré que la sous-unité β lie le GTP échangeable (*e. g.* Gealhen et Haley, 1977; Linse et Mandelkow, 1988). Par déduction, la sous-unité α lie le GTP non échangeable. Le GTP échangeable est lié avec une affinité de l'ordre de 10 ou 100 nM en présence ou absence de magnésium (Dustin, 1984). Il peut être échangé contre du GDP, mais avec une affinité environ trois fois plus faible. Lors de l'assemblage des microtubules, le GTP échangeable est hydrolysé en GDP. Cependant, ce GDP n'est plus échangeable dans les microtubules (Dustin, 1984), sauf à l'extrémité *plus* des microtubules. On a donc proposé que l'extrémité *plus* expose les sous-unités β (Mitchison, 1993), et donc que les extrémités *moins* exposent les sous-unités α .

Les deux sous-unités de tubuline sont très proches par leur séquence en acides aminés : environ 50% d'identité (Burns et SurrIDGE, 1994), trahissant leur apparition par duplication d'un gène ancestral. La tubuline peut subir de nombreuses modifications posttraductionnelles (pour une revue voir : MacRae, 1997). Elle peut subir des branchements de chaînes latérales d'acides aminés comme une polyglycylation dans les domaines carboxyterminaux des tubulines α et β (Redeker *et al.*, 1994), la tubuline β peut être palmitoylée permettant un ancrage dans la membrane plasmique (Zambito et Wolff, 1997) ou encore subir un cycle de tyrosination-détyrosination de la tubuline α (pour une revue, voir Lafanechère et Job, 2000).

Au bilan, le nombre de gènes codant les sous-unités de la tubuline et la diversité des modifications posttraductionnelles que ces sous-unités subissent génèrent une grande diversité de tubulines.

I.2.2 Données structurales sur les microtubules

I.2.2.1 Structure des microtubules

La structure des microtubules a été étudiée par microscopie électronique à transmission. Dans les cellules, les techniques conventionnelles d'observation sur coupe ultra-fine ont révélé que les microtubules sont formés de dimères de tubuline alignés le long de 13 ± 2 directrices appelées protofilaments (figure I-1a). La structure des microtubules a ensuite été étudiée *in vitro*, où une grande diversité de structures a été mise en évidence (Mandelkow *et al.*, 1984). Les premiers travaux ont utilisé la technique de coloration négative qui présente l'inconvénient de déformer les microtubules. La cryomicroscopie a ensuite permis de connaître la structure des microtubules avec une très grande finesse (*e. g.* Chrétien *et al.*, 1992; Mandelkow et Mandelkow, 1985). Il est apparu que les dimères s'alignent le long d'hélices dont le pas est de 12 nm (Métoz *et al.*, 1997). Au total, la surface d'un microtubule est un arrangement régulier de sous-unités de tubuline (figure I-1a). L'arrangement des sous-unités peut être décrit à l'aide d'hélices de dimères (Dustin, 1984). L'arrangement des dimères de tubuline à la surface des microtubules a longtemps été discuté. Un autre modèle que celui présenté ici a été proposé, avec un arrangement des dimères sur des hélices différentes. La question a été tranchée par des études sur des microtubules décorés par des moteurs moléculaires. Les auteurs ont pu saturer la surface de microtubules avec des moteurs moléculaires telle que la kinésine. La structure du complexe, beaucoup plus gros que le microtubule nu a ensuite été plus facile à analyser, mettant en évidence la structure des microtubules (Harrison *et al.*, 1993; Kikkawa *et al.*, 1995) Ce réseau possède toutefois une irrégularité, observée aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Kikkawa *et al.*, 1994). Compte tenu du nombre de protofilaments (en général 13), les hélices décrivant la surface des microtubules ne sont pas continues. Ces discontinuités s'alignent sur une ligne appelée ligne de suture (figure I-1b).

Les études de diffraction des électrons en cryomicroscopie ont également révélé une polarité structurale des microtubules : il apparaît une forme de chevron à la surface des microtubules en raison de phénomènes de diffraction entre les protofilaments situés en premier et arrière plan. Ces chevrons définissent une extrémité *plus* et une extrémité *moins* pour chaque microtubule (Sosa et Chrétien, 1998). De plus, les études en diffraction ont permis d'obtenir des informations sur la structure des microtubules. La tubuline, en présence de Zn^{2+} s'assemble non pas en microtubules mais en feuillets plans, formés par assemblage latéral de protofilaments (Nogales *et al.*, 1998b).

Cette structure bidimensionnelle de type cristallin a été mise à profit pour tenter de résoudre la structure de la tubuline. Les auteurs ont ainsi obtenu des cartes à 6,5 Å puis 3,5 Å (Nogales *et al.*, 1998b; Nogales *et al.*, 1995). La structure tridimensionnelle de la tubuline a pu être connue avec encore plus de précision, lors que la structure de la protéine FtsZ a été élucidée.

I.2.2.2 Structure de la tubuline

La tubuline n'a pas pu être cristallisée et les auteurs ont utilisé les feuillettes de tubuline qui se forment en présence de Zn^{2+} . Pour établir la carte de densité électronique, . La difficulté a été d'obtenir l'équivalent d'un dérivé lourd pour obtenir les phases des électrons diffractés (Janin et Delepierre, 1994). Les auteurs ont alors mis à profit la liaison du taxol à la tubuline. Cette drogue se lie de façon stœchiométrique et a permis d'obtenir les phases des faisceaux d'électrons diffractés (Nogales *et al.*, 1998b; Nogales *et al.*, 1995; Wolf *et al.*, 1996). Le modèle atomique de la tubuline a ensuite été inséré dans la carte de densité électronique des microtubules, donnant un modèle à très haute résolution des microtubules. Ce modèle a permis notamment de situer le site de liaison échangeable du GTP sur la sous-unité b à l'interface entre deux dimères. Il a confirmé que la sous-unité β est exposée à l'extrémité *plus* des microtubules. Enfin, il fournit une base structurale pour comprendre le mode d'action de drogues telles que le taxol, ou encore le mode d'interaction de protéines telles que les moteurs moléculaires avec les microtubules (Nogales *et al.*, 1999).

I.2.2.3 FtsZ, homologue de la tubuline chez les procaryotes

FtsZ est codée par un gène impliqué dans la septation lors de la division cellulaire chez de nombreuses bactéries (archéobactéries et eubactéries), ainsi que dans le chloroplaste des plantes supérieures (pour une revue voir : Erickson, 1997). Puis cette protéine a été purifiée et étudiée *in vitro*. Elle a une masse d'environ 40 kDa, est exprimée sous la forme d'un monomère qui lie une molécule de GTP et possède une activité GTPasique (Mukherjee *et al.*, 1993; Mukherjee et Lutkenhaus, 1998). Chez les bactéries FtsZ est de plus capable de s'assembler en courts fragments linéaires analogues à des protofilaments, ou encore en petits anneaux (« mini-rings », Erickson et Stoffler, 1996; Erickson *et al.*, 1996). Les fragments de protofilaments ont une conformation allongée et droite quand ils contiennent du GTP et une conformation courbée quand ils contiennent du GDP, tout comme le dimère de tubuline (Lu *et al.*, 2000). Pour la protéine du chloroplaste, il a été observé que l'hydrolyse du GTP en GDP était liée à la formation de tubules de 5 nm de diamètre. Ces tubules sont creux comme les microtubules, et formés par l'assemblage d'enchaînements linéaires de FtsZ. Toutefois, dans ce cas les protofilaments sont hélicoïdaux. De plus, cet assemblage est favorisé par le magnésium comme dans le cas des microtubules (Erickson, 1997).

La protéine FtsZ possède une homologie de séquence faible mais significative avec les différentes tubulines (Erickson et Stoffler, 1996). Par ailleurs, en même temps que la structure atomique de la tubuline a été obtenue, la protéine FtsZ était cristallisée et sa structure atomique résolue (Lowe et Amos, 1998). La principale information a été la très forte homologie de structure entre les deux protéines, malgré la faible homologie de séquence. Le repliement général de FtsZ est en effet très comparable à celui des tubulines α et β , hormis quelques boucles qui manquent dans FtsZ (Erickson, 1998). Le site de liaison du GTP est également conservé entre les deux protéines, et n'est homologue au site de liaison du GTP d'aucune autre protéine G (Nogales *et al.*, 1998a). FtsZ apparaît donc comme l'ancêtre procaryote probable des tubulines eucaryotes. Cette protéine possède en effet des homologies de séquence, des propriétés biochimique semblables et intervient dans la séparation du matériel génétique, comme les microtubules. Récemment, ZipA a été identifiée comme une protéine se liant aux assemblages de FtsZ et qui possède des homologies de séquence avec les protéines associées aux microtubules Tau et MAP2. De plus, ZipA induit la formation de faisceaux de tubules de FtsZ, propriété décrite pour les MAP et la protéine Tau (Hale *et al.*, 2000; RayChaudhurri, 1999).

I.3 L'assemblage des microtubules in vitro

I.3.1 Les éléments nécessaires à l'assemblage de microtubules

L'assemblage de la tubuline en microtubules a été très étudié *in vitro*. Lors de la formation des microtubules, les solutions deviennent turbides, visqueuses et diffusent très fortement la lumière. Les cinétiques d'assemblage de la tubuline ont pu être étudiées aisément grâce à la spectrophotométrie, la diffusion de lumière et la viscosimétrie. De plus, les propriétés de liaison des nucléotides, différentes entre les dimères libres et les microtubules ont été exploitées. La tubuline peut être radiomarquée par incubation de la tubuline avec du GTP radiomarqué. Le GTP se lie à la tubuline β (site échangeable). Puis dans les microtubules l'échange est bloqué : les microtubules sont donc radiomarqués et ne peuvent pas perdre le marquage sans être dénaturés. Des dosages radioactifs ont ainsi été mis au point (*e. g.* Caudron *et al.*, 2000; Pirollet *et al.*, 1987).

In vitro, les éléments nécessaires à l'assemblage sont : un tampon adéquat, du GTP, une température suffisante et enfin une concentration minimale de tubuline. Le tampon est constitué soit de Mes soit de Pipes. La température est au minimum de 20°C, en général de 30 à 35°C (Kuchnir-Fygenon *et al.*, 1994). La concentration minimale de tubuline au-dessous de laquelle il n'y a pas d'assemblage est appelée concentration critique. Cette concentration critique varie avec les conditions de l'expérience. Si ces conditions sont réunies, l'assemblage débute et la quantité de tubuline assemblée suit une évolution du type de la figure I-2. Au

cours de cette évolution, on distingue classiquement trois phases : la nucléation, l'élongation et l'état stationnaire.

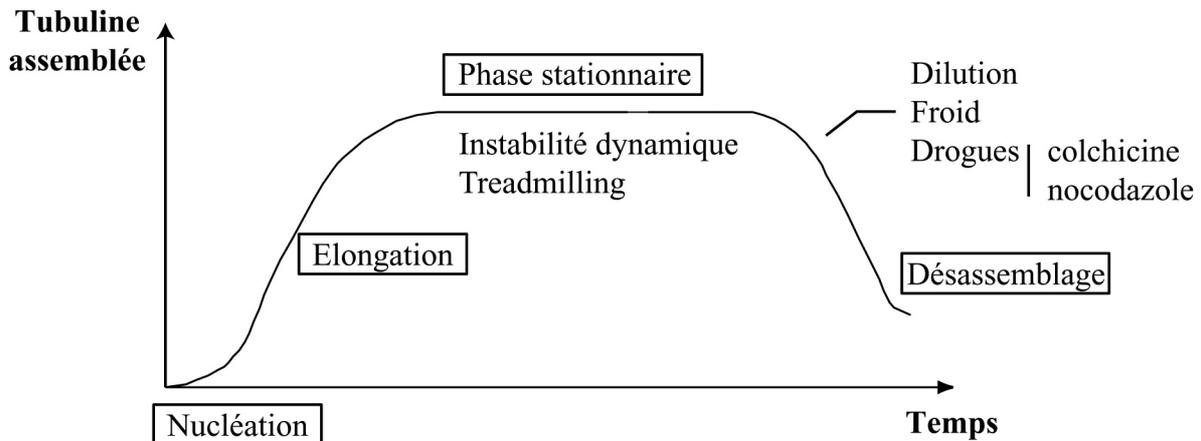


Figure I-2 : Phases de l'assemblage de tubuline en microtubules *in vitro*. Les différentes phases de l'assemblage sont encadrées. La phase stationnaire se caractérise par un échange constant de sous-unités entre les microtubules et la solution (voir texte). L'instabilité dynamique et le *treadmilling* sont les deux modalités décrivant actuellement ces échanges. Quelques facteurs déclenchant le désassemblage des microtubules ont été indiqués.

La première phase est une phase silencieuse, où aucun assemblage n'est détecté (figure I-2). Durant cette étape, des amorces de microtubules mal connues se forment. Cette étape peut être supplée en ajoutant des amorces stabilisées par pontage covalent (Koshland *et al.*, 1988). Durant la phase d'élongation, les microtubules s'allongent par addition de sous-unités de tubuline aux extrémités des microtubules. L'état stationnaire qui est ensuite atteint se caractérise par une proportion fixe de tubuline assemblée en microtubules. Durant cette phase, la concentration en tubuline libre est égale à la concentration critique. L'état stationnaire n'est cependant qu'un équilibre apparent : son maintien nécessite une consommation permanente d'énergie grâce à l'hydrolyse de GTP en GDP. Enfin, l'assemblage des microtubules est réversible : la dilution de la solution, un refroidissement ou encore l'ajout de certaines drogues comme la colchicine entraînent un désassemblage des microtubules. Le désassemblage libère de la tubuline-GDP. A la suite d'une phase de désassemblage, le retour à des conditions favorables à l'assemblage (réchauffement, ajout de GTP...) permet un nouvel assemblage. Les mécanismes précis de ces différentes étapes sont encore relativement mal connus.

1.3.2 Cinétiques d'assemblage

Différents paramètres de la réaction d'assemblage des microtubules ont été mesurés : la quantité de tubuline assemblée au cours du temps, la vitesse d'hydrolyse du GTP en GDP lors de l'assemblage, l'effet de la concentration en tubuline, GTP et GDP, l'effet de cofacteurs

comme les ions divalents (Bayley *et al.*, 1994; Carlier *et al.*, 1987b; Carlier et Pantaloni, 1978; David-Pfeuty *et al.*, 1978; Hamel *et al.*, 1986; Hamel *et al.*, 1984; Johnson et Borisy, 1977; Kuchnir-Fygenson *et al.*, 1995; Lin et Hamel, 1987; Margolis, 1981; O'Brien et Erickson, 1989; O'Brien *et al.*, 1987; Voter et Erickson, 1984). Ces résultats ont été interprétés avec les modèles de cinétique classique, fondés sur la loi d'action de masse. L'agrégation de protéines en polymères hélicoïdaux tels que les microtubules repose sur les modèles de condensation – nucléation élaborés par Oosawa et collaborateurs (Oosawa et Higashi, 1967; Oosawa et Kasai, 1962). Dans ces modèles, la concentration en tubuline-GTP libre est supposée avoir une influence continue et directe sur la réaction d'assemblage des microtubules. Ainsi le taux de nucléation et la vitesse d'élongation des microtubules dépendraient tout au long de la réaction de la concentration en tubuline-GTP libre.

I.3.3 Nucléation

La nucléation consiste en la formation des microtubules à partir des dimères. Cette étape est mal connue et différents modèles ont été proposés (Figure I-3). Des études cinétiques ont suggéré que les microtubules se forment en une étape par assemblage de 11 à 15 dimères, sans doute sous forme d'une petite hélice (Flyvbjerg *et al.*, 1996b). La formation de nouveaux microtubules est alors nécessairement rare car la rencontre simultanée de 11 à 15 dimères est un événement peu probable. De plus, une baisse même faible de la concentration en tubuline libre entraîne une baisse du taux de formation de nouveaux microtubules très forte : le taux de nucléation est alors proportionnel à la concentration en tubuline à la puissance 11 à 15 ! Toutefois, d'autres auteurs ont proposé une dépendance moins forte du taux de nucléation vis à vis de la concentration en tubuline, avec des exposants de nucléation compris entre 7 et 12 (Carlier et Pantaloni, 1978; Kuchnir-Fygenson *et al.*, 1994; Kuchnir-Fygenson *et al.*, 1995; Voter et Erickson, 1984). Malgré cela, il est classiquement admis que la nucléation n'a lieu qu'au tout début de la réaction d'assemblage, si bien que le nombre de microtubules formés est rapidement déterminé. La suite de la réaction ne consisterait alors qu'en l'élongation des microtubules formés et une nucléation très restreinte. Si l'exposant de nucléation est plus faible que le nombre de protofilaments, alors la nucléation des microtubules a lieu en deux étapes au moins, avec formation de complexes intermédiaires. Ces complexes contiendraient un nombre limité de dimères et sont appelés pour cela oligomères de tubuline. Des oligomères de tubuline ont d'ailleurs été observés dans des solutions de tubuline, soit lors d'études par diffraction des rayonnements (Spann *et al.*, 1987), soit par cryomicroscopie électronique à transmission (Erickson, 1974; Kirschner *et al.*, 1975). Enfin, la formation d'oligomères de tubuline a été associée à une hydrolyse de GTP (Carlier *et al.*, 1997). Dans un second temps, ces oligomères s'associeraient mais ne formeraient pas directement un microtubule. Il a en effet été montré que lors de phases précoces de

l'assemblage, les solutions de tubuline contiennent des feuillets plans de tubuline qui formeraient ensuite des microtubules (Erickson, 1974; Kirschner *et al.*, 1975).

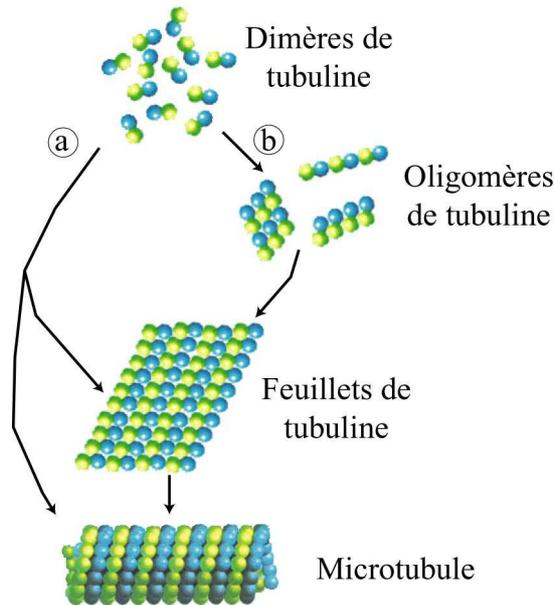


Figure I-3 : Modèles de la nucléation des microtubules *in vitro*. La nucléation est l'étape de formation des microtubules à partir de tubuline dimérique. Différents modèles ont été proposés (voir le texte). En (a) les microtubules se forment directement à partir de dimères de tubuline, alors qu'en (b) il se forme des oligomères de tubuline intermédiaires. De plus, la formation des microtubules passe très probablement par un assemblage sous forme de feuillets de tubuline qui se referment en microtubules.

I.3.4 Elongation

L'élongation des microtubules consiste en l'addition de dimères de tubuline aux extrémités des microtubules, qui sont les seules parties réactives des microtubules. L'ajout d'une sous-unité est strictement couplée à l'hydrolyse du GTP en GDP du site échangeable de la tubuline β . L'existence d'un découplage entre ces deux étapes a longtemps été évoquée (Caplow, 1992; Carlier et Pantaloni, 1978; Mitchison et Kirschner, 1984), mais il n'a pas pu être démontré de façon convainquante et toutes les études récentes l'excluent (Voter *et al.*, 1991; Walker *et al.*, 1991). Les descriptions de la phase d'élongation reposent sur la loi d'action de masse : la vitesse d'élongation des microtubules est fonction de la concentration en tubuline-GTP disponible pour l'assemblage (*e. g.* Walker *et al.*, 1988). Cependant, des résultats suggèrent que la vitesse d'élongation des microtubules est limitée par la probabilité que les sous-unités de tubuline se lient à l'extrémité des microtubules, plutôt que par la vitesse de diffusion des sous-unités de tubuline (Kuchnir-Fygenson *et al.*, 1994).

Des observations en cryomicroscopie électronique ont été réalisées. Lors des phases d'assemblages, les extrémités de microtubule ont en général un bout franc, prolongé par de

courts prolongements de quelques protofilaments, suggérant que les microtubules s'allongent par ajout de dimères de tubuline le long des protofilaments (Mandelkow *et al.*, 1991). Toutefois, il a également été observé des microtubules se terminant par un feuillet plan de dimères de tubuline, en cours de fermeture (Chrétien *et al.*, 1995). Ce mécanisme serait à l'origine de la ligne de suture des microtubules. Les auteurs ont également montré que la longueur de ces feuillets variait avec la concentration en tubuline-GTP disponible pour l'assemblage. Au voisinage de la concentration critique en tubuline, le temps de fermeture des feuillets deviendrait plus petit que le temps nécessaire à l'allongement des microtubules, qui auraient alors un bout franc (Chrétien *et al.*, 1995). L'élongation des microtubules aurait donc lieu en deux étapes : addition de dimères de tubuline formant un feuillet plan, puis fermeture du feuillet en tubule (figure I-4).

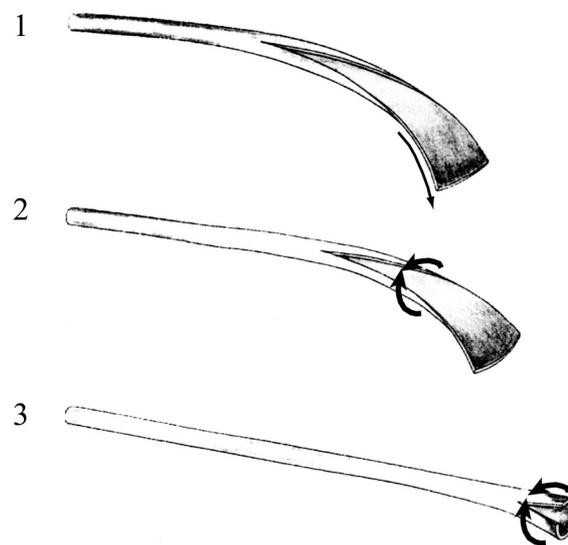


Figure I-4 : Modèle de l'élongation des microtubules proposé par Chrétien *et al.*, 1995. Les microtubules s'allongeraient (1) sous forme de feuillets de tubuline aux extrémités, puis (2 et 3) ces feuillets se refermeraient en microtubule. La ligne de fermeture serait à l'origine de la « cicatrice » des microtubules (voir le texte).

I.3.5 Désassemblage

L'assemblage de la tubuline est un phénomène réversible : une dilution, le froid, le calcium ou encore des drogues dépolymérisantes comme la colchicine ou le nocodazole entraînent le désassemblage des microtubules en tubuline-GDP (figure I-2).

Les microtubules désassemblent exclusivement par leurs extrémités. Le désassemblage massif de microtubules soumis à une dilution a été étudié en cryomicroscopie électronique à transmission. Les microtubules prennent alors un aspect de « peau de banane » : des fragments de protofilaments recourbés vers l'extérieur sont visibles, en même temps que s'accumulent des oligomères circulaires (« mini-rings ») de tubuline dans la

solution (Mandelkowitz *et al.*, 1991). Le désassemblage se ferait donc par petits fragments de microtubules et non dimère par dimère. Puis les oligomères se désagrègeraient en dimères.

I.3.6 La dynamique des microtubules à l'état stationnaire

L'état stationnaire correspond à une phase où la quantité de tubuline assemblée reste constante. Toutefois, cet équilibre n'est qu'apparent : il nécessite un apport continu d'énergie, sous forme de GTP qui est hydrolysé en GDP. A l'état stationnaire, la concentration en tubuline libre est égale à la concentration critique et il y a un échange permanent de sous-unités de tubuline entre la solution et les microtubules (Johnson et Borisy, 1977). L'étude de la dynamique de l'état stationnaire a mis en lumière des aspects inattendus. Deux mécanismes ont été proposés pour rendre compte de l'échange permanent de sous-unités entre la solution et les microtubules.

I.3.6.1 Le treadmilling

Il a été observé que les extrémités *plus* et *moins* des microtubules possèdent des propriétés cinétiques différentes. Ainsi, à l'état stationnaire l'extrémité *plus*, qui se termine par la sous-unité β a tendance à s'allonger par addition de dimères de tubuline. Au contraire, l'extrémité *moins* a tendance à désassembler. De ces différences d'assemblage résulte un flux de sous-unités de tubuline dans le microtubule, ou phénomène du tapis roulant (*treadmilling*) (Margolis, 1981; Margolis et Wilson, 1981 ; Figure I-5a). L'importance du *treadmilling* a longtemps été sous-estimée. Il a fallu que ce phénomène soit observé directement dans des cellules pour être réellement pris en compte dans la physiologie du cytosquelette (Rodionov et Borisy, 1997).

I.3.6.2 L'instabilité dynamique

L'instabilité dynamique a été mise en évidence grâce à la mesure de la longueur des microtubules au cours de l'état stationnaire (Mitchison et Kirschner, 1984). Les auteurs ont observé qu'à l'état stationnaire, alors que la quantité de tubuline assemblée reste constante, la longueur moyenne des microtubules fluctue fortement. A l'état stationnaire, il existe donc des microtubules qui assemblent et d'autres qui désassemblent, alors que la concentration en tubuline disponible pour l'assemblage reste constante. Ce phénomène a été baptisé « instabilité dynamique de la croissance des microtubules » (Mitchison et Kirschner, 1984).

L'instabilité dynamique a ensuite été observée directement sur des microtubules individuels, grâce à la vidéomicroscopie. Des microtubules ont été suivis au cours du temps et leur longueur mesurée (Figure I-5b). Les microtubules passent effectivement de phases d'élongation plutôt lentes à des phases de raccourcissement très rapide, pouvant aboutir à la disparition du microtubule (Horio et Hotani, 1986). Les transitions entre ces phases sont rares

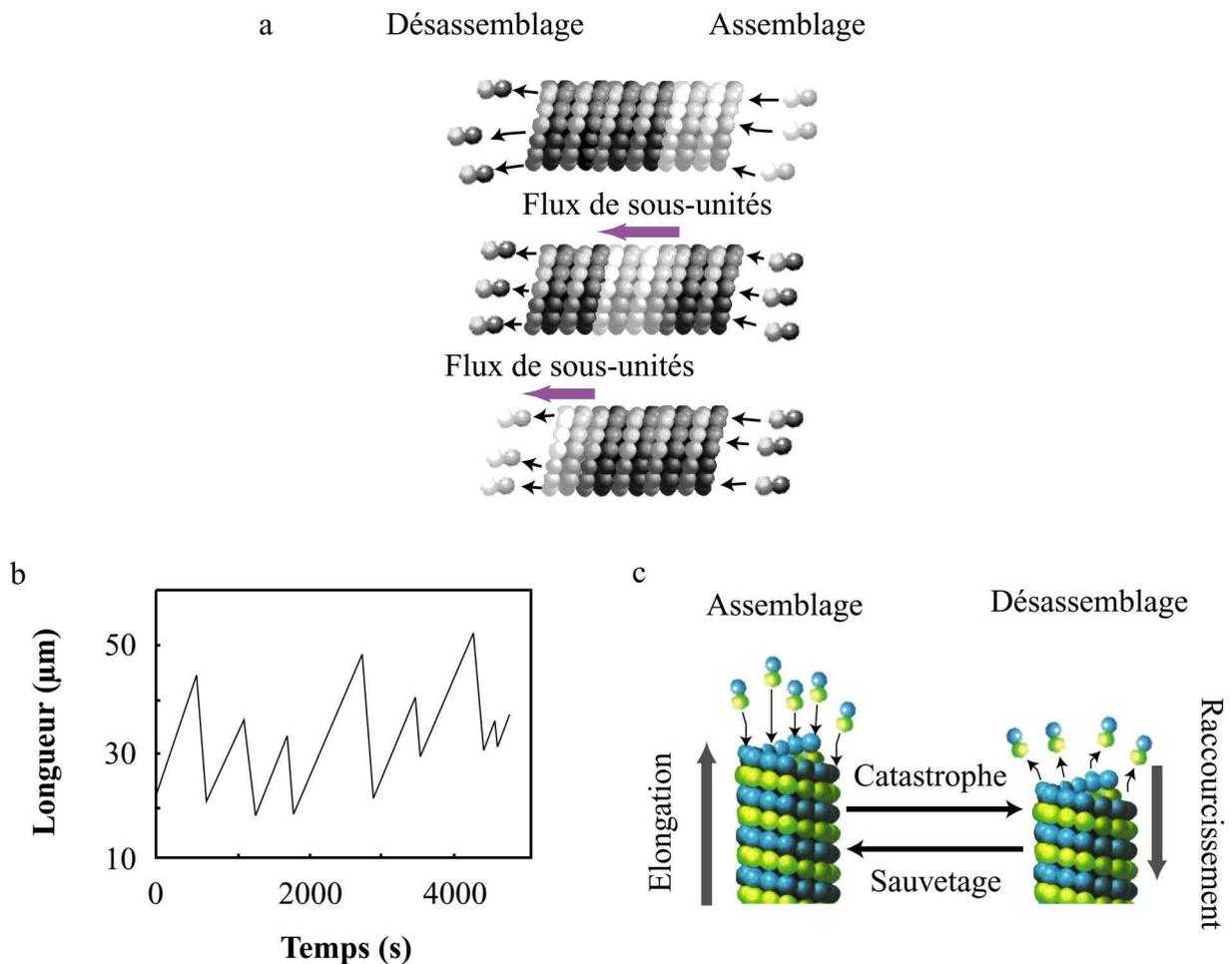


Figure I-5 : Dynamique des microtubules à l'état stationnaire. (a) Représentation schématique du *treadmilling* ou tapis roulant. Pour suivre leur comportement certains dimères ont été représentés de couleur plus claire. Les dimères s'ajoutent séquentiellement à l'extrémité d'assemblage, si bien qu'ils sont de plus en plus loin de cette extrémité. Dans le même temps, des dimères sont libérés au niveau de l'extrémité de désassemblage. Les dimères de tubuline semblent donc traverser le microtubule de l'extrémité d'assemblage vers l'extrémité de désassemblage (d'après Margolis et Wilson, 1981). (b) Evolution au cours du temps de la longueur d'un microtubule à l'état stationnaire observé en vidéomicroscopie (d'après Bayley *et al.*, 1994). (c) Représentation schématique de l'instabilité dynamique (voir le texte).

et aléatoires. On a de plus observé des phases de pause, où les microtubules n'assemblent et ne désassemblent pas (Walker *et al.*, 1988). Enfin, les vitesses de raccourcissement et d'élongation dépendent des conditions de l'expérience, mais à conditions égales sont les mêmes pour tous les microtubules (Horio et Hotani, 1986; Walker *et al.*, 1988). Ainsi, les extrémités de microtubules existeraient sous trois grandes configurations : assemblage, désassemblage ou pause. Les transitions entre assemblage et désassemblage sont appelées

catastrophes, et les transitions entre désassemblage et assemblage sont appelées sauvetages (figure I-5c). Les pauses sont beaucoup plus rares que les catastrophes et les sauvetages. Quatre paramètres décrivent l'instabilité dynamique : les vitesses d'élongation et de raccourcissement, et les fréquences de catastrophe et de sauvetage. Ces quatre paramètres suffisent à modéliser l'évolution d'une population de microtubules (Flyvberg *et al.*, 1994).

Le mécanisme de l'instabilité dynamique n'est pas connu précisément. L'hypothèse de tous les modèles est que les extrémités des microtubules réagissent différemment avec leur environnement moléculaire, selon qu'ils assemblent ou qu'ils désassemblent. L'assemblage et le désassemblage seraient des processus très différents, influencés par des facteurs différents.

Pour expliquer les changements de configuration des extrémités des microtubules, on a longtemps évoqué une « coiffe de GTP » (pour une revue, voir Carlier, 1991). Certaines études avaient suggéré que l'hydrolyse du GTP soit retardée par rapport à l'addition de la tubuline à l'extrémité des microtubules (David-Pfeuty *et al.*, 1978). De ce fait, les microtubules étaient terminés par un certain nombre de sous-unités de tubuline-GTP. Il a été proposé que si toutes les sous-unités de l'extrémité hydrolysaient le GTP avant que de nouvelles sous-unités ne viennent les coiffer, le microtubule devenait instable et désassemblait. Les arguments en faveur de ce modèle étaient d'une part la mesure d'un décalage entre hydrolyse et assemblage, et d'autre part d'ordre structural. Les sous-unités de tubuline ont une conformation allongée en présence de GTP et recourbée après hydrolyse du GTP en GDP. Ce changement de conformation est empêché dans les microtubules par les interactions entre dimères. Il en résulte une accumulation de contraintes dans le microtubule, qui serait donc fondamentalement instable (Caplow *et al.*, 1994). De plus, certaines études suggèrent que la tubuline complexée au GDP et la tubuline sans nucléotide lié puissent augmenter la fréquence des catastrophes (Caplow et Shanks, 1995). Enfin, les microtubules formés en présence d'analogues du GTP non hydrolysables ou lentement hydrolysables sont plus stables que les microtubules constitués de tubuline-GDP (Dye et Williams, 1996; Hyman *et al.*, 1992).

Le modèle de coiffe GTP n'est cependant plus d'actualité. Les mesures d'un décalage entre assemblage et hydrolyse du GTP n'ont en effet pas pu être reproduites. De plus, des auteurs ont tenté d'estimer la longueur de la coiffe de GTP lors d'expériences de dilution de solutions microtubulaires. Leur hypothèse est que la longueur de la coiffe devrait augmenter avec la vitesse d'élongation des microtubules. Par conséquent, en diluant des microtubules en cours d'élongation à des vitesses croissantes, ils devraient commencer à désassembler après des temps croissants, correspondant à l'hydrolyse du GTP de la coiffe. Cependant, après dilution, les microtubules commencent immédiatement à désassembler, indépendamment de leur vitesse d'élongation (Voter *et al.*, 1991; Walker *et al.*, 1991). La coiffe serait donc très courte et indépendante de la vitesse d'élongation. De plus, toutes les simulations numériques des modèles de coiffe ne parviennent pas à modéliser l'évolution de solutions

microtubulaires. Une variante du modèle de la coiffe GTP a été proposée : le modèle de coiffe latérale, qui décrit assez correctement le comportement des microtubules (pour une revue, voir Bayley *et al.*, 1994). Ce modèle postule lui aussi un retard de l'hydrolyse du GTP en GDP sur l'addition d'un dimère de tubuline.

Les études en cryomicroscopie ont confirmé l'existence de différentes configurations des extrémités de microtubules : bout franc ou feuillet se refermant en tube lors de l'élongation, et « peau de banane » lors du désassemblage (Chrétien *et al.*, 1995; Mandelkow *et al.*, 1991; Simon et Salmon, 1990). Ces observations ne donnent pas d'explication au changement de configuration. Toutefois, les différences importantes de structures entre les configurations d'assemblage et de désassemblage expliquent que les transitions sont difficiles et donc peu fréquentes. Enfin, des auteurs ont observé que la lumière des microtubules contiennent des protubérances (« *plugs* ») dont le nombre varie en fonction de la dynamique des microtubules. Les protubérances sont en effet plus/moins nombreuses lors des phases d'assemblage que lors des phases de désassemblage (Azhar et Murphy, 1990). Toutefois, aucun lien de cause à effet n'a été établi entre ces protubérances et la dynamique des microtubules. Les changements de configuration entre assemblage et désassemblage sont donc probablement liés à des propriétés structurales des microtubules.

L'instabilité dynamique de l'assemblage des microtubules n'est pas le seul caractère remarquable des microtubules. Les solutions microtubulaires constituent en effet des systèmes dissipatifs, et sont donc capables d'auto-organisation spatiale et temporelle.

I.3.7 Les solutions microtubulaires constituent un système dissipatif

Les solutions microtubulaires présentent toutes les caractéristiques des systèmes dissipatifs, qui consomment continûment de l'énergie, sont irréversibles au sens thermodynamique et hors d'équilibre. L'assemblage des microtubules s'accompagnant de l'hydrolyse du GTP en GDP, l'assemblage utilise de la tubuline-GTP alors que le désassemblage libère de la tubuline-GDP. La réaction d'assemblage et désassemblage des microtubules est donc irréversible. De plus, une sous-unité de tubuline ne peut être réincorporée dans un microtubule que si elle échange le GDP contre du GTP. A l'état stationnaire, le maintien d'une quantité constante de tubuline assemblée en microtubules consomme donc de l'énergie en continu. La consommation permanente d'énergie est une des caractéristiques des systèmes dissipatifs. Enfin, l'état stationnaire est un état hors d'équilibre, qui ne se maintient que grâce à la consommation d'énergie. Les processus dissipatifs ont de plus la propriété d'osciller dans le temps et de s'auto-organiser dans l'espace. Ce sont des processus non linéaires, pour lesquels peu d'exemples sont connus (Ross *et al.*, 1988).

Des oscillations temporelles ont été observées dans les solutions microtubulaires : au cours du temps, la tubuline subit des phases d'assemblage et désassemblage successives, le désassemblage pouvant être complet. Puis peu à peu, les oscillations s'amortissent et la

quantité de tubuline assemblée atteint un état stationnaire (Carlier *et al.*, 1987b; Pirollet *et al.*, 1987). Différentes conditions ont été décrites pour produire des oscillations : dans tous les cas, la vitesse initiale d'assemblage doit être rapide par rapport à la vitesse de régénération de la tubuline-GTP à partir de la tubuline-GDP (Carlier *et al.*, 1987b; Mandelkow *et al.*, 1988; Pirollet *et al.*, 1987). Il a été proposé que la tubuline-GDP produite lors du désassemblage se trouve dans un premier temps sous forme d'oligomères qui la séquestrent, empêchant l'échange GDP/GTP (Lange *et al.*, 1988). Ces résultats indiquaient que la réaction d'assemblage / désassemblage des microtubules pouvait être non linéaire. Les capacités d'auto-organisation spatiale ont été ensuite observées.

Des motifs réguliers se forment en effet lorsque de la tubuline est assemblée à forte concentration et en présence d'un système régénérateur de GTP. Dans des boîtes de culture cellulaire, il apparaît des motifs géométriques réguliers, dont les auteurs ont proposé qu'ils soient analogues à ceux observés dans les cristaux liquides (Hitt *et al.*, 1990). Dans des cuves de spectrophotomètre, il se forme des bandes horizontales millimétriques alternativement blanches et noires. Des observations en lumière polarisée et en diffusion des neutrons aux petits angles ont montré que les bandes étaient constituées de microtubules parallèles, orientés dans des directions perpendiculaires d'une bande à l'autre (Tabony et Job, 1992b). Les théories des systèmes dissipatifs prédisent que les structures formées sont sensibles aux champs faibles comme la gravité ou les champs magnétiques. De plus, cette sensibilité n'existe que pendant une courte période, avant une « bifurcation » : selon l'orientation du champ avant la bifurcation, les structures n'auront pas la même géométrie. Ces prédictions ont été vérifiées pour la gravité soit au laboratoire en centrifugeuse, soit en microgravité dans l'espace (Papaseit *et al.*, 2000; Tabony et Job, 1992a).

I.3.8 Les effecteurs de la dynamique microtubulaire *in vitro*

La dynamique d'assemblage des microtubules est très variable avec les conditions de l'expérience. Nous nous limiterons ici à des agents chimiques et pharmacologiques, les effecteurs protéiques mis en jeu dans les cellules seront envisagés plus loin.

I.3.8.1 Effets de tampon

La composition du tampon est un facteur essentiel pour les microtubules. Les tampons les plus utilisés pour étudier la tubuline sont constitués de Pipes. Ce tampon est réputé avoir un effet stabilisant sur la tubuline et les microtubules, comparable aux MAP. Ce tampon est celui qui a permis de découvrir l'instabilité dynamique (Mitchison et Kirschner, 1984) et sert de référence dans les études de l'assemblage des microtubules.

L'ajout de composés tels que le DMSO ou le glycérol modifie fortement la cinétique d'assemblage des microtubules : le glycérol en particulier augmente la vitesse d'assemblage, la quantité de tubuline assemblée à l'état stationnaire et stabilise les microtubules qui

désassemblent moins vite quand le GTP a été consommé (O'Brien et Erickson, 1989; Voter et Erickson, 1984). Corrélativement, l'instabilité dynamique est très diminuée en présence de glycérol (Shilstra *et al.*, 1991). Toutefois, les mécanismes d'action de ces composés ne sont pas connus.

Le magnésium a également un effet important sur l'assemblage des microtubules : il augmente la vitesse d'assemblage ainsi que la consommation de GTP au cours de l'état stationnaire (O'Brien *et al.*, 1987). Cet effet est sans doute dû en partie à l'activité GTPasique de la tubuline : comme l'ATP, le GTP est hydrolysé en GDP en présence d'un ion magnésium par molécule de GTP. Toutefois, l'effet du magnésium est observé pour des concentrations beaucoup plus fortes que la concentration en nucléotides. Le magnésium a donc un effet spécifique sur la dynamique d'assemblage des microtubules (Carlier et Pantaloni, 1978; O'Brien *et al.*, 1987).

Enfin, différents nucléotides peuvent être utilisés pour déclencher l'assemblage de la tubuline en microtubules. L'ATP, l'UTP ou des analogues du GTP lentement hydrolysables (GMPPcP) suffisent à déclencher l'assemblage de la tubuline en microtubules. Toutefois, les microtubules assemblés en présence d'ATP sont moins dynamiques que ceux formés en présence de GTP (O'Brien et Erickson, 1989). Les microtubules assemblés en présence de GMPPcP sont stables et ne désassemblent pas lors d'une dilution (Hyman *et al.*, 1992). D'autre part, l'hydrolyse du GTP en GDP passe par un intermédiaire GDP-Pi où la liaison entre les phosphates β et γ a eu lieu, mais où le phosphate inorganique γ (Pi) n'a pas été libéré. Des analogues de cet intermédiaire ont suggéré que la tubuline-GDP-Pi puisse stabiliser les microtubules (Caplow *et al.*, 1989). Toutefois, la signification physiologique de ces effets est très délicate à interpréter (*e. g.* Caplow et Shanks, 1998).

I.3.8.2 Drogues

De nombreux poisons anti-microtubulaires ont été identifiés parmi les alcaloïdes végétaux ou les toxines animales. Les techniques de criblage systématique de chimiothèques permettent d'en découvrir encore très régulièrement (Lopes *et al.*, 1997). Toutes ces drogues perturbent la mitose et sont des agents anticancéreux potentiels, ainsi que des outils pour l'étude du cytosquelette.

Les alcaloïdes de la famille de la vinblastine par exemple causent un désassemblage de la tubuline en provoquant son agrégation sous forme d'amas paracrystallins. La tubuline est ainsi séquestrée sous une forme non fonctionnelle. La colchicine cause également le désassemblage des microtubules. La colchicine se lie lentement et irréversiblement aux dimères de tubuline, qui hydrolysent le GTP en GDP. Les complexes tubuline-colchicine formés peuvent enfin s'agréger en assemblages amorphes. Le taxol et ses dérivés au contraire stimulent l'assemblage des microtubules et stabilisent les microtubules. Le taxol se lie préférentiellement sur les microtubules, sur la sous-unité β . De plus, il provoque la formation

de faisceaux de microtubules. Le taxol provoque donc la séquestration de la tubuline dans des microtubules de structure normale, mais non dynamiques et regroupés en faisceaux (pour une revue, voir Wilson et Jordan, 1994).

I.4 La dynamique d'assemblage des microtubules *in vivo*

I.4.1 Organisation du cytosquelette *in vivo*

Dans les cellules, les réseaux microtubulaires existent sous trois grands types de configuration : le réseau interphasique, le fuseau mitotique et les cils et flagelles. Dans les cellules en interphase, les microtubules rayonnent dans tout le cytoplasme à partir d'un point unique : le centrosome (Figure I-6a). L'organisation du cytosquelette est polarisée : les microtubules ont leur extrémité plus à la périphérie de la cellule et sont ancrés au centrosome par leur extrémité moins. Toutefois, certains microtubules ne sont pas ancrés au centrosome, notamment dans les neurones. Dans les neurones en outre, les microtubules axonaux sont effectivement orientés avec l'extrémité moins vers le corps cellulaire, mais dans les dendrites, on trouve des microtubules dans les deux orientations (Black et Baas, 1989).

Dans les cellules en division, les microtubules forment le fuseau mitotique (Figure I-6b). Les microtubules sont ancrés par leur extrémité moins au pôle du fuseau, formé par l'un des deux centrosomes. Certains microtubules rayonnent vers les pôles de la cellule et sont appelés microtubules astraux. D'autres sont dirigés vers la plaque métaphasique et sont appelés microtubules interpolaires. Les microtubules interpolaires s'attachent aux chromosomes au niveau des kinétochores et participent à la séparation du matériel génétique (Alberts *et al.*, 2000).

Enfin, dans certaines cellules spécialisées, ils forment les cils et flagelles (Figure I-6c). Les cils et flagelles sont des structures complexes qui ont une organisation typique (Alberts *et al.*, 2000).

Comme *in vitro*, les microtubules sont très dynamiques dans les cellules si bien que les microtubules sont renouvelés en permanence. Dans les réseaux interphasiques, le temps de demi renouvellement des microtubules est de 5 à 10 minutes, variable selon le type cellulaire (Sammak et Borisy, 1988; Sammak *et al.*, 1987; Schulze et Kirschner, 1986; Shelden et Wadsworth, 1993), pouvant dépasser trois heures dans les axones (Lim *et al.*, 1989). Dans le fuseau mitotique, il est de l'ordre de quelques secondes (Salmon *et al.*, 1984). Selon les cellules, les microtubules présentent donc des degrés de stabilité très différents. Ce renouvellement des microtubules a lieu par assemblage et désassemblage des microtubules. Les mécanismes de ces échanges ont été identifiés et correspondent à l'instabilité dynamique et au treadmilling.

L'instabilité dynamique a été le premier mécanisme identifié dans les cellules. Toutefois, les fluctuations de longueurs des microtubules sont de moindre importance, et les

fréquences de catastrophe et de sauvetage sont plus faibles que celles mesurées *in vitro* (Cassimeris *et al.*, 1988; Sammak et Borisy, 1988; Schulze et Kirschner, 1988; Sheldon et Wadsworth, 1993). Ces résultats suggèrent que l'instabilité dynamique soit étroitement contrôlée dans les cellules. L'existence de ces régulations a été confirmée par des études sur des microtubules polymérisés dans des extraits de Xénope : la dynamique des microtubules est variable selon la phase du cycle cellulaire. Ainsi, les microtubules polymérisés dans des extraits mitotiques sont beaucoup plus dynamiques que les microtubules polymérisés dans des extraits interphasiques (Belmont *et al.*, 1990; Gard et Kirschner, 1987; Verde *et al.*, 1990).

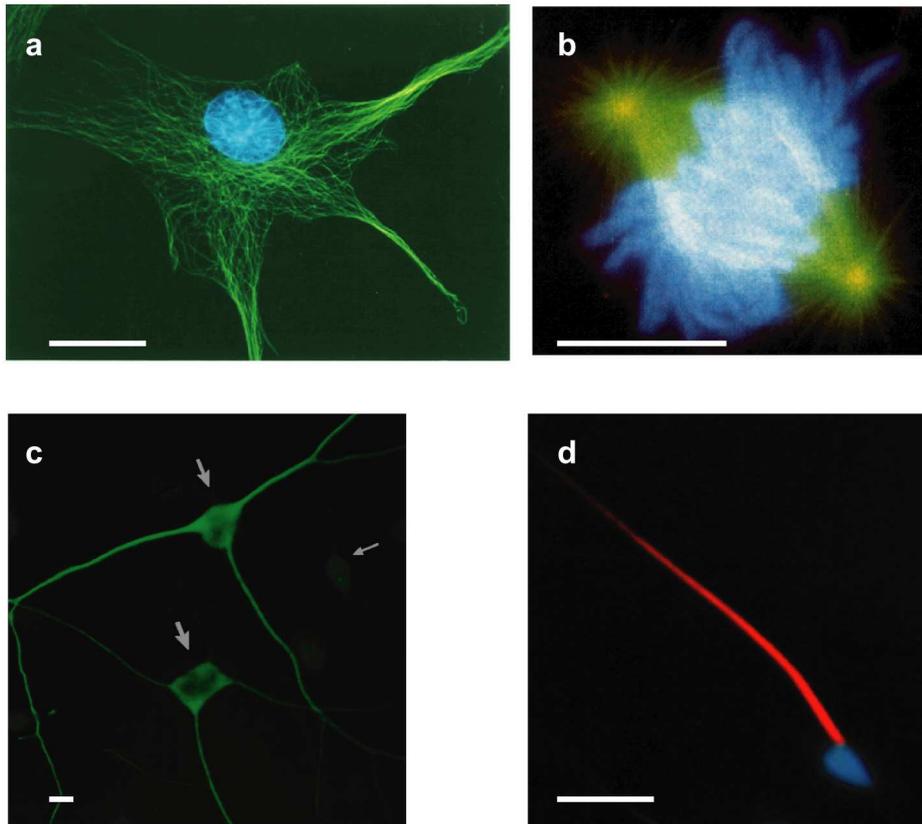


Figure I-6 : Organisation des microtubules dans les cellules. (a) Observation d'une cellule en interphase après marquage de l'ADN (Hoechst, en bleu) et des microtubules (immunofluorescence indirecte, en vert). On distingue le noyau et les microtubules qui rayonnent dans tout le cytoplasme à partir d'un point situé à proximité du noyau, le centrosome. (b) Cellule en métaphase de mitose. On distingue les chromosomes alignés sur la plaque métaphasique et les microtubules formant le fuseau mitotique, ainsi que les deux asters. (c) Marquage des microtubules par immunofluorescence indirecte dans des neurone en culture. Les microtubules jouent un rôle essentiel dans les prolongements des neurones (axones et dendrites) et le système nerveux est très riche en microtubules. (d) Observation d'un spermatozoïde après coloration de l'ADN (Hoechst, en bleu) et de la tubuline (immunofluorescence indirecte, en rouge) révélant le flagelle. Barre d'échelle : 10 μm .

La mise en évidence du treadmilling a nécessité l'affinement des techniques de vidéomicroscopie sur cellule. Il a été observé que certains microtubules se détachaient du centrosome et migraient vers la périphérie de la cellule à une vitesse trop élevée pour qu'il s'agisse de diffusion simple (Keating *et al.*, 1997). Le déplacement du microtubule pouvait soit se faire grâce à des moteurs moléculaires qui transporteraient le fragment de microtubule, soit par treadmilling sous la forme d'une vague de polymérisation/dépolymérisation. La démonstration du treadmilling a été effectuée en utilisant la technique de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching, récupération de fluorescence après photoblanchiment). De la tubuline couplée à un fluorochrome était microinjectée dans des cellules, entraînant un marquage uniforme des microtubules cellulaires. Une « marque » était ensuite réalisée sur un microtubule sous contrôle microscopique à l'aide d'un laser. Le laser détruit localement et irréversiblement la fluorescence. Puis les dimensions du microtubule étaient mesurées au cours du temps : longueur totale et longueurs de part et d'autre de la marque. Les auteurs ont ainsi montré qu'un microtubule pouvait se déplacer en gardant une longueur constante, sans que la marque de photoblanchiment se déplace. Ce résultat prouvait que le microtubule s'était déplacé sous la forme d'une vague de polymérisation et dépolymérisation, donc par treadmilling. Quantitativement, le treadmilling semble contribuer très fortement au renouvellement des microtubules interphasiques (Keating *et al.*, 1997; Rodionov et Borisy, 1997).

Les microtubules étant ancrés au centrosome par leur extrémité moins, on a proposé que la dynamique du réseau microtubulaire soit essentiellement due à des échanges au niveau de l'extrémité plus. Cependant, des microtubules se raccourcissant par leur extrémité moins ont également été observés dans les cellules, après détachement du centrosome. L'extrémité moins des microtubules n'est donc pas totalement inactive et contribue au renouvellement du cytosquelette microtubulaire, au moins à proximité du centrosome (Vorobjev *et al.*, 1999).

Ainsi, les propriétés dynamiques et intrinsèques des microtubules sont mises à profit par les cellules. Ces propriétés des microtubules ont été utilisées pour modéliser différents processus cellulaires. Ainsi, il a été proposé que la séparation des chromosomes en anaphase ait lieu par un mécanisme de diffusion biaisée (Garel *et al.*, 1987), mécanisme qui a été démontré dans des systèmes acellulaires reconstitués (Koshland *et al.*, 1988; Lombillo *et al.*, 1995). De même, l'instabilité dynamique des microtubules permettrait aux microtubules d'explorer la cellule (Holy et Leibler, 1994). Ce mécanisme de recherche et capture serait impliqué dans l'attachement des microtubules aux kinétochores lors de la métaphase (Hayden *et al.*, 1990).

Dans les cellules, les propriétés des microtubules sont étroitement régulées. Les modifications de la dynamique des microtubules sont corrélés avec des modifications posttraductionnelles de la tubuline.

I.4.2 Modifications posttraductionnelles de la tubuline

De nombreuses modifications posttraductionnelles affectent la tubuline, mais les enzymes et la fonction de ces modifications sont mal connues. Certaines modifications de la tubuline sont corrélées à des changements dans la dynamique des microtubules. Cependant, les modifications posttraductionnelles de la tubuline semblent être la conséquence de la dynamique d'assemblage des microtubules (pour une revue, voir MacRae, 1997). Le cas de la détyrosination et tyrosination de la tubuline α est sans doute le mieux connu.

La tubuline α est synthétisée avec comme séquence carboxyterminale : Glu-Glu-Tyr (tubuline-tyr). La tyrosine peut être éliminée par une carboxypeptidase encore inconnue, conduisant à la formation de tubuline détyrosinée (pour une revue, voir Lafanechère et Job, 2000). Une tyrosine peut être ajoutée à la tubuline détyrosinée, par une tubuline tyrosine ligase qui a été identifiée et dont le gène a été cloné (Ersfeld *et al.*, 1993). De façon remarquable, la tubuline tyrosine ligase (TTL) est donc capable de former une liaison peptidique en dehors du ribosome. De plus, la tubuline détyrosinée ou tubuline-glu peut perdre le glutamate carboxyterminal, conduisant à une tubuline ayant perdu ses deux derniers acides aminés (appelée tubuline- $\Delta 2$; Paturle-Lafanechère *et al.*, 1991). Cette étape est irréversible, on ne connaît pas de tubuline glutamate ligase.

La carboxypeptidase qui agit sur la tubuline-Tyr n'est active que sur la tubuline des microtubules. Au contraire, la tubuline tyrosine ligase n'agit que sur le dimère de tubuline libre. Ainsi, la tubuline qui se trouve dans des microtubules particulièrement peu dynamiques comme ceux des neurones sera détyrosinée, mais pas tyrosinée. Les microtubules stables, comme ceux que l'on trouve dans les neurones sont ainsi majoritairement constitués de tubuline-glu et de tubuline- $\Delta 2$. Les microtubules neuronaux contiennent 13% de tubuline-tyr, 40% de tubuline-glu et 35% de tubuline- $\Delta 2$. Plus généralement, l'accumulation de tubuline- $\Delta 2$ est un marqueur de la dynamique des microtubules.

Les différentes formes de tubuline (tubuline-tyr, -glu et $\Delta 2$) ont pu être séparées par des techniques biochimiques : leurs propriétés d'assemblage en microtubules ne peuvent pas être distinguées (Paturle-Lafanechère *et al.*, 1991; Paturle-Lafanechère *et al.*, 1994). Dans les cellules, la stabilisation des microtubules par le taxol induit la tyrosination des microtubules. En revanche, la détyrosination des microtubules induite par la microinjection d'anticorps inhibant la TTL n'entraîne pas la stabilisation des microtubules (Wehland et Weber, 1987). L'accumulation de tubuline-glu et de tubuline- $\Delta 2$ est donc la conséquence d'une faible dynamique des microtubules, mais n'en est pas la cause.

Des anticorps spécifiques des différentes isoformes de tubuline sont disponibles qui permettent des études de biochimie et d'immuno-histochimie. Ces études ont montré que la tubuline- $\Delta 2$ s'accumule non seulement dans les cellules comportant des microtubules stables, mais aussi dans des tumeurs. Cette accumulation s'expliquerait par l'élimination de l'activité

tubuline tyrosine ligase dans ces cellules tumorales. Le gène de la tubuline tyrosine ligase serait donc un suppresseur de tumeur (Lafanechère *et al.*, 1998).

I.5 Le contrôle de la dynamique d'assemblage des microtubules

Toutes les étapes de la dynamique des microtubules sont étroitement contrôlées dans les cellules. Nous verrons en particulier que la nucléation des microtubules a lieu exclusivement au centrosome, mais ne se produit pas dans le cytoplasme. Nous verrons ensuite que certaines protéines stabilisent les microtubules, alors que d'autres au contraire les déstabilisent. Ensuite, certaines protéines assurent l'interconnexion entre le réseau microtubulaire et le reste du cytosquelette. Enfin, des protéines se liant spécifiquement aux extrémités de microtubules ont été identifiées.

I.5.1 Effecteurs contrôlant la nucléation des microtubules

La nucléation des microtubules ayant lieu uniquement au centrosome, c'est là que les effecteurs de la nucléation ont été principalement recherchés.

I.5.1.1 Le centrosome

Le centrosome est constitué d'une paire de centrioles et d'un matériel péricentriolaire. Les centrioles sont eux-mêmes constitués de microtubules et leur rôle est inconnu. Les centrioles sont dupliqués lors de chaque cycle cellulaire selon un processus complexe faisant intervenir de nombreux gènes (pour une revue voir, Lange *et al.*, 2000a). Le matériel péricentriolaire est constitué de nombreuses protéines dont le rôle n'est pas clairement défini (pour une revue, voir Whitehead et Salisbury, 1999).

Le matériel péricentriolaire contient sans doute de nombreux effecteurs protéiques contrôlant la nucléation des microtubules.

I.5.1.2 La tubuline γ

Dans le matériel péricentriolaire, on trouve la tubuline γ , intégrée dans des complexes multi-protéiques en forme d'anneaux : les γ -TuRCs. Ces γ -TuRCs sont constitués de 13 molécules de tubuline γ arrangés en une amorce d'hélice, ainsi que de plusieurs autres protéines. Des études en tomographie électronique et reconstruction tridimensionnelle suggèrent que les microtubules soient nucléés sur ces γ -TuRCs (Moritz *et al.*, 1995; Zheng *et al.*, 1995).

Les modalités de la nucléation par les γ -TuRCs sont très discutées et ont conduit à deux modèles exclusifs (Erickson, 2000; Erickson et Stoffler, 1996). Le premier modèle propose que les 13 sous-unités de tubuline γ servent chacune d'amorce à un protofilament. Dans ce cas, les sous-unités de tubuline γ seraient associées par des interactions latérales et le γ -TuRC coifferait l'extrémité du microtubule (Moritz *et al.*, 1995; Oakley, 1995; Zheng *et al.*,

1995). De plus, dans ce modèle, la forme cylindrique du microtubule serait établie d'emblée. En se fondant sur des arguments thermodynamiques et des observations en microscopie électronique, il a été proposé au contraire que les sous-unités de tubuline γ seraient associés longitudinalement et formeraient un protofilament. Ce protofilament permettrait alors à des dimères de tubuline d'établir des interactions latérales pour former un feuillet bidimensionnel. Ce modèle réconcilierait alors la nucléation *in vitro* et *in vivo*, puisque dans les deux cas on obtiendrait comme intermédiaire un feuillet de tubuline (Erickson et Stoffler, 1996).

L'étude par la technique de « peptide spot » a permis d'identifier des sites d'interaction potentiels entre la tubuline γ et le dimère de tubuline. La cartographie de ces sites sur la structure tridimensionnelle du dimère de tubuline et de la tubuline γ suggère que la tubuline γ et le dimère de tubuline interagissent latéralement (Llanos *et al.*, 1999). Récemment, des analyses en microscopie électronique à transmission et des immunomarquages à l'or colloïdal d'extrémités de microtubules nucléés sur γ -TuRC ont cependant fortement suggéré que le γ -TuRC coiffe l'extrémité des microtubules (Keating et Borisy, 2000; Moritz *et al.*, 2000; Wiese et Zheng, 2000).

I.5.1.3 MINUS

Le polypeptide MINUS a été identifié et caractérisé comme inhibiteur de la nucléation des microtubules *in vitro*. Il a été purifié par fractionnement cellulaire à partir d'extraits de cerveau. MINUS inhibe la nucléation des microtubules sans affecter la vitesse d'élongation ou la stabilité des microtubules. Cette inhibition est contrôlée par l'état de phosphorylation de MINUS. Micro-injecté dans des cellules, MINUS provoque une dépolymérisation transitoire des microtubules. MINUS est le premier effecteur du cytosquelette microtubulaire identifié agissant uniquement sur la nucléation (Fanara *et al.*, 1999).

I.5.2 Stabilisation des microtubules

Si les microtubules assemblés *in vitro* à partir de tubuline pure sont intrinsèquement instables, les microtubules dans les cellules présentent une dynamique plus lente et étroitement contrôlée. On n'a longtemps connu comme effecteur de la dynamique des microtubules que les protéines stabilisantes comme les protéines associées aux microtubules (MAP). Plus récemment, des protéines ayant une activité déstabilisante ont été découvertes. Parmi les protéines déstabilisant les microtubules se trouvent en particulier les protéines de la famille de la stathmine ainsi que des moteurs moléculaires. Récemment enfin, des protéines interagissant à la fois avec le cytosquelette microtubulaire et avec d'autres composantes du cytosquelette ont été identifiées. Ces protéines agissent comme des intégrateurs de tout le cytosquelette (pour une revue, voir Valiron *et al.*, Soumis).

Les premiers effecteurs de la stabilité des microtubules ont été caractérisés dans les tissus nerveux, où les microtubules sont abondants. Ce sont des protéines associées aux

microtubules : les MAP (pour une revue, voir Hirokawa, 1994). Elles ont été purifiées à partir d'homogénats de cerveau. L'homogénat est tout d'abord clarifié puis incubé à 30°C en présence de glycérol et GTP, ce qui provoque l'assemblage de la tubuline en microtubules. Puis les microtubules sont sédimentés par centrifugation, ainsi que les protéines associées. Les microtubules sont alors désassemblés au froid, puis soumis à un ou plusieurs cycles d'assemblage / désassemblage. On obtient ainsi environ 60% de tubuline et 40% de MAP. Ce type de protocole a permis de caractériser principalement trois MAP neuronales : deux MAP de haut poids moléculaire, MAP1 et MAP2, et une MAP de plus bas poids moléculaire, Tau (Dustin, 1984).

MAP1 est une protéine de très haut poids moléculaire apparaissant sous la forme de deux bandes de 300 et 350 kDa en gel d'électrophorèse, MAP1A et MAP1B. Les protéines MAP1 sont filamenteuses et semblent connecter les microtubules entre eux dans les dendrites et les axones (Dustin, 1984). Le gène codant MAP1B a été invalidé par recombinaison homologue chez la souris. Les individus homozygotes survivaient mais présentaient un retard de développement du système nerveux et le poids de leur cerveau était plus faible que chez les individus sauvages. MAP1B n'a donc pas un rôle vital mais participe au développement normal du système nerveux (Takei *et al.*, 1997).

MAP2 et les protéines Tau font partie d'une même famille, ainsi qu'une autre protéine, MAP4. L'analyse par électrophorèse en conditions dénaturantes fait apparaître trois isoformes de MAP2 : MAP2a et MAP2b de 280 kDa et MAP2c de 70 kDa, qui sont toutes trois produites par épissage alternatif d'un seul transcrite (Garner et Matus, 1988). Les protéines Tau présentent également plusieurs isoformes de poids moléculaire compris entre 50 et 70 kDa (Dustin, 1984), produites là encore par épissage alternatif d'un seul transcrite. Les protéines MAP2 et Tau sont strictement neuronales. MAP2 est localisée essentiellement dans les axones, alors que Tau est surtout retrouvée dans le corps cellulaire et les dendrites des neurones (Binder *et al.*, 1985; Matus *et al.*, 1981). De plus, l'expression de ces MAP et de leurs différentes isoformes est contrôlée au cours du développement.

La protéine MAP4 est apparentée à Tau et MAP2, mais est exprimée dans toutes les cellules non neuronales des vertébrés. Ces trois protéines ont en commun leur site de liaison aux microtubules, situé dans la partie carboxyterminale de ces MAP. Il consiste en un motif d'acides aminés imparfaitement répété. Toutes ces protéines ont une activité stabilisatrice *in vitro*. MAP2 et Tau stimulent l'assemblage des microtubules et ralentissent leur désassemblage lors de dilution ou en présence de drogues (Dustin, 1984). En stabilisant les microtubules, les MAP diminuent leur dynamique. De plus, l'activité de ces MAP est contrôlée par leur état de phosphorylation. Plusieurs protéines kinases peuvent les phosphoryler *in vitro*. La protéine kinase MARK provoque le détachement des MAP des microtubules en phosphorylant les MAP sur leur domaine de liaison aux microtubules, augmentant la dynamique d'assemblage - désassemblage (Drewes *et al.*, 1998).

Le gène codant la protéine Tau a été invalidé chez la souris. L'histologie du système nerveux est apparemment normal, et dans des neurones en cultures la formation des neurites n'est pas altérée. En revanche, dans certains axones de petit calibre, la stabilité des microtubules est abaissée. Par ailleurs, la protéine MAP1B est surexprimée par rapport aux souris sauvages, suggérant que MAP1B puisse suppléer la fonction de Tau (Harada *et al.*, 1994).

Une autre protéine associée aux microtubules a été identifiée grâce au très haut degré de stabilité qu'elle confère aux microtubules : la protéine STOP (pour une revue, voir Bosc *et al.*, 1999). La protéine STOP stabilise les microtubules *in vitro* et *in vivo* contre le facteur déstabilisant le plus sélectif : le froid. La protéine STOP porte deux types de motifs de liaison aux microtubules. Ces deux sites de liaison sont constitués de motifs d'acides aminés différents de ceux des protéines Tau et MAP2. Différentes isoformes, générées par épissage alternatif sont exprimés dans différents tissus et à différents stades du développement. Dans les neurones, la protéine STOP serait nécessaire à la différenciation cellulaire et à l'établissement des neurites. Elle est également responsable du faible taux de renouvellement des microtubules caractéristique des cellules nerveuses (Guillaud *et al.*, 1998). Dans les cellules en division, la protéine STOP est associée au fuseau mitotique, où les microtubules sont au contraire très dynamiques (Denarier *et al.*, 1998). Cette association pourrait participer à la fidélité de la mitose. D'autre part, l'invalidation du gène de la STOP chez la souris provoque des anomalies comportementales similaires à la schizophrénie (Andrieux *et al.*, en préparation). Enfin, des homologues de la protéine STOP ont été retrouvés dans toutes les classes de vertébrés. Des protéines apparentées à la STOP ont également été identifiées, définissant une nouvelle famille de MAP (Bosc *et al.*, en préparation).

Chez l'homme, il a été montré que les deux principaux gènes impliqués dans la lissencéphalie de type I sont des protéines stabilisant les microtubules. Dans cette pathologie, les patients présentent un encéphale à surface lisse et une désorganisation des couches corticales. La première est Lis1 qui interagit avec les microtubules *in vitro* et diminue la fréquence des catastrophes (Saphir *et al.*, 1997). De plus, Lis1 est retrouvé dans de nombreux types cellulaires, mais est enrichie dans les neurones où elle interagit avec la dynéine (Smith *et al.*, 2000). La seconde protéine est la doublecortine, qui est exprimée dans les neurones en cours de migration et de différenciation (Francis *et al.*, 1999). Le site de liaison de la doublecortine aux microtubules a été identifié comme un motif répété, différent de celui de MAP2 et Tau. Ce site de liaison est responsable de la stabilisation des microtubules (Horesh *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2000). Enfin, Lis1 et la doublecortine interagissent *in vitro* et *in vivo*. Elles interagissent avec les microtubules ainsi qu'avec la tubuline dimérique. Elles ont un effet additif sur la stimulation de l'assemblage des microtubules et leur stabilisation (Caspi *et al.*, 2000). Ces deux protéines jouent donc sans doute un rôle central lors du développement du système nerveux.

Des homologues de ces protéines ont été identifiées, ainsi que des protéines qui leur seraient apparentées. DCAMKL1 est ainsi une protéine kinase qui présente des homologies de séquence avec la doublecortine, qui est exprimée dans les neurones en cours de migration dans le système nerveux central. De plus, DCAMKL1 s'associe aux microtubules *in vitro* et stimule l'assemblage de tubuline pure *in vitro* (Lin *et al.*, 2000). Une seconde famille de MAP semble donc se dessiner.

D'autres protéines stabilisant les microtubules ont également été identifiées chez le Xénope. La disponibilité de tests *in vitro* donnant accès à différents stades du cycle cellulaire a permis de suivre le contrôle de leur activité au cours des différentes phases. La protéine XMAP230, par exemple stabilise fortement les microtubules en augmentant leur vitesse d'élongation et en abaissant le taux de catastrophe. Sa localisation varie au cours du cycle : localisée dans le noyau pendant l'interphase, XMAP230 s'associe au fuseau mitotique seulement pendant la métaphase. Elle est phosphorylée pendant la mitose (Andersen *et al.*, 1994; Andersen et Karsenti, 1997). XMAP215 est une autre protéine stabilisatrice, dont on connaît plusieurs homologues dans divers groupes animaux : elle augmente fortement la vitesse d'élongation de l'extrémité *plus* (Vasquez *et al.*, 1994). La protéine TOGp a été identifiée comme l'homologue de XMAP215 chez l'homme (Charasse *et al.*, 1998). Un site de liaison au microtubule a été identifié dans la partie aminotermine de TOGp, et la partie carboxyterminale est capable de lier la tubuline. De plus, TOGp peut lier des assemblages de tubuline en forme de feuillets (Spittle *et al.*, 2000). Les phénotypes de mutants d'homologues de XMAP215 suggèrent que la fonction de XMAP215 soit nécessaire en mitose.

Les protéines stabilisant les microtubules sont les effecteurs du cytosquelette microtubulaire les mieux connus. Récemment, de nouvelles familles de MAP ont été découvertes, qui interviennent à différentes étapes du cycle cellulaire. Depuis la découverte de l'instabilité dynamique, on pressentait que des effecteurs déstabilisant les microtubules devaient exister. La découverte de ces facteurs de catastrophes a toutefois été plus difficile.

1.5.3 Déstabilisation des microtubules

La première protéine déstabilisant les microtubules est la stathmine, une petite protéine de 18 kDa environ. Cette protéine était connue comme une oncoprotéine s'accumulant dans certaines cellules tumorales (pour une revue, voir Ozon *et al.*, 1997). Des expériences de fractionnement cellulaire et un test de mesure de l'instabilité dynamique dans des extraits d'œufs de Xénope ont montré qu'elle stimulait fortement les catastrophes (Belmont et Mitchison, 1996). La stathmine forme un complexe stable avec une stoechiométrie de deux tubulines pour une stathmine, la liaison étant modulée par l'état de phosphorylation de la stathmine (Jourdain *et al.*, 1997). Toutefois, cette activité de séquestration ne semble pas responsable de l'activité de facteur de catastrophe. En variant le pH des expériences, les deux activités ont pu être dissociées (Howell *et al.*, 1999). De plus,

des expériences avec des mutants de délétion de la stathmine ont localisé les activités de séquestration et de facteur de catastrophe sur différentes parties de la protéine (Larsson *et al.*, 1999a; Larsson *et al.*, 1999b). Une autre protéine apparentée à la stathmine a également été identifiée : SCG10. SCG10 est une protéine neuronale, très enrichie dans les cônes de croissance des neurites, qui se lie aux microtubules, inhibe leur assemblage et provoque leur désassemblage (Riederer *et al.*, 1997).

Des moteurs moléculaires de la famille des kinésines sont également capables de déstabiliser les microtubules. Le moteur XKCM1 identifié chez le Xénope est ainsi capable d'augmenter la fréquence des catastrophes *in vitro*. Cette activité nécessite l'hydrolyse d'ATP en ADP, mais n'est pas associée à une motilité. XKCM1 est associée aux extrémités des microtubules et sa présence y est corrélée à une modification de l'agencement des sous-unités de tubuline (Desai *et al.*, 1999). L'activité déstabilisante de XKCM1 semble nécessaire pour la formation du fuseau mitotique dans des extraits d'œufs de Xénope (Walczak *et al.*, 1996). Chez la levure *S. cerevisiae*, la kinésine Kar3p provoque également le désassemblage des microtubules dans le fuseau mitotique. L'activité de désassemblage de Kar3p a lieu au pôle du fuseau, uniquement au niveau de l'extrémité *moins* (Saunders *et al.*, 1997).

Enfin, il a été récemment montré que la protéine Rev de HIV1 désassemble les microtubules *in vitro*. Les microtubules sont désassemblés sous la forme d'anneaux constitués de tubuline et de la protéine Rev. La protéine Rev se lie par son extrémité aminotermine à la face de la tubuline exposée vers l'extérieur des microtubules. L'extrémité aminotermine de la protéine Rev présente des homologies de séquence avec le domaine moteur de la kinésine Kin1. L'infection par HIV1 est associée à une désorganisation du cytosquelette microtubulaire. Cette désorganisation pourrait être due à la protéine Rev et expliquerait en partie l'effet cytotoxique du virus (Watts *et al.*, 2000).

1.5.4 Intégrateurs du cytosquelette

Longtemps suspectées, les protéines liant les microtubules et capables d'interagir avec d'autres éléments du cytosquelette commencent seulement à être découvertes.

Des protéines de la famille des plakines, des protéines associées aux filaments intermédiaires, semblent impliquées dans l'interconnexion de tous les réseaux du cytosquelette. Le gène *BPAG1* code ainsi plusieurs protéines par épissage alternatif du transcrit. Certaines isoformes sont associées à la fois aux filaments intermédiaires et à l'actine (Yang *et al.*, 1996). D'autres isoformes sont associées aux filaments intermédiaires et aux microtubules, qu'elles stabilisent. L'inactivation génique de cette dernière isoforme chez la souris est associée à la présence de microtubules courts, instables et désorganisés (Yang *et al.*, 1999). D'autre part, la protéine MACF est une protéine de 608 kDa associée avec les microfilaments d'actine et les microtubules. Le domaine de liaison aux microtubules est situé dans la partie carboxyterminale de la protéine, alors que la partie aminotermine contient un

domaine putatif de liaison à l'actine ainsi qu'un domaine homologue aux plakines. Le domaine de type plakine est d'ailleurs très homologue à la protéine BPAG1 (Leung *et al.*, 1999). Ainsi, une nouvelle famille de protéines associées aux microtubules et intégrant les différents réseaux du cytosquelette semble émerger.

I.5.5 Protéines liant l'extrémité des microtubules

Récemment, des protéines liant spécifiquement l'extrémité des microtubules ont été identifiées. Ces protéines agissent ainsi sur la dynamique des microtubules directement sur le « site actif » des microtubules. La protéine Tip1p de la levure *Schizosaccharomyces pombe* est ainsi localisée à l'extrémité *plus* des microtubules. Elle stabilise les microtubules dans des régions spécifiques du cortex cellulaire en diminuant la fréquence de catastrophes. Tip1p participe ainsi à l'établissement de l'organisation du cytosquelette microtubulaire (Brunner et Nurse, 2000).

Des protéines de la famille EB1 sont également associées aux extrémités de microtubules, bien que l'on ne sache pas si cette interaction est directe ou si elle passe par une autre protéine. Les protéines de cette famille sont ainsi localisées en partie au centrosome et surtout à l'extrémité *plus* des microtubules (pour une revue voir, Tirnauer et Bierer, 2000). Les protéines de la famille EB1 sont également associées au produit du gène *APC*, un suppresseur de tumeur fréquemment muté dans les cancers du colon. EB1 serait responsable de la localisation de la protéine APC à l'extrémité des microtubules (Mimory-Kiyosue *et al.*, 2000). Les protéines de la famille EB1 semblent importantes pour la dynamique des microtubules. La liaison de la protéine EB1 aux extrémités de microtubules a été corrélée à un marqueur de la dynamique des microtubules : la détyrosination de la tubuline α . Les microtubules peu dynamiques contiennent surtout de la tubuline détyrosinée : EB1 est liée à l'extrémité de seulement 12% de ces microtubules. En revanche, EB1 est liée à 75% des microtubules très dynamiques, constitués surtout de tubuline tyrosinée (Infante *et al.*, 2000).

I.6 Objectifs de cette étude

Le cytosquelette microtubulaire joue un rôle central dans l'organisation et la vie cellulaire. Son étude *in vitro* a mis en lumière des aspects inattendus tels que ses propriétés d'autoorganisation, le *treadmilling* ou l'instabilité dynamique. De façon remarquable, les cellules exploitent les propriétés fondamentales des microtubules observées *in vitro*. Les différents contrôles jouent à toutes les étapes de la formation, l'élongation et le désassemblage des microtubules. La compréhension des différentes étapes de la réaction d'assemblage/désassemblage des microtubules est encore imparfaite : le lien entre les cinétiques d'assemblage et les observations de microtubules individuels en vidéomicroscopie est ainsi mal établi. Les étapes de la nucléation sont également mal connues, et les intermédiaires conduisant de la tubuline dimérique aux microtubules n'ont pas été caractérisés. Enfin, de

nombreux effecteurs de la dynamique d'assemblage / désassemblage des microtubules restent à découvrir. Cette étude aborde ces trois aspects du cytosquelette microtubulaire.

I.6.1 Réévaluation des paramètres contrôlant la dynamique d'assemblage des microtubules *in vitro*

Après avoir présenté les méthodes et techniques utilisées, nous étudierons la cinétique d'assemblage et désassemblage des microtubules à partir de tubuline-GTP. Les conditions choisies permettent de mesurer simultanément et dans les mêmes conditions tous les paramètres de la réaction. Les résultats obtenus pour de larges gammes de concentrations en tubuline mettent en évidence les facteurs limitant la réaction d'assemblage. De plus, nous montrons, comme cela est prédit par les modèles d'instabilité dynamique, que les paramètres contrôlant l'assemblage d'une part et le désassemblage d'autre part, sont distincts. Enfin, nous prédisons l'importance de formes oligomériques de la tubuline dans le contrôle de la nucléation des microtubules, ainsi que dans le désassemblage.

I.6.2 Recherche d'effecteurs endogènes contrôlant la dynamique d'assemblage – désassemblage des microtubules

Dans un second temps, nous avons cherché à stabiliser, isoler et caractériser des formes oligomériques de la tubuline influençant la réaction d'assemblage / désassemblage des microtubules *in vitro*. Des conditions de stabilisation par pontage covalent modéré de fragments de microtubules ont été mises au point. Les produits stabilisés ont été purifiés et caractérisés. Nous avons ainsi obtenu des oligomères de tubuline servant d'intermédiaire dans la nucléation des microtubules. De plus, nous avons obtenu des conditions expérimentales où les microtubules formés sont stables et ne désassemblent pas. Ces microtubules sont toutefois dynamiques. Les conditions mises au point permettront de rechercher des effecteurs stimulant le désassemblage des microtubules.

I.6.3 Recherche de nouveaux effecteurs de la dynamique d'assemblage des microtubules.

Enfin, dans un dernier temps nous avons développé une technique de chromatographie d'affinité utilisant comme hameçon la tubuline et permettant de purifier des partenaires de la tubuline. La purification de ces partenaires peut être effectuée à partir d'extraits cellulaires et tissulaires variés. Nous espérons ainsi obtenir une gamme variée de partenaires de la tubuline, qui pourraient être des effecteurs de la dynamique du cytosquelette microtubulaire. Les techniques de cartographie peptidique par spectrométrie de masse, permettent une identification rapide de ces partenaires en exploitant les banques de données de séquences. Les protéines identifiées pourront ensuite être étudiées par les techniques classiques de biochimie et biologie cellulaire.

Chapitre II : Matériels et méthodes

II Matériels et méthodes

II.1 Purification de la tubuline

La tubuline est purifiée à partir de cerveau de bœuf, tissu particulièrement riche en microtubules. Des cervelles de bœufs fraîches sont récupérées aux abattoirs. En chambre froide, le cervelet et les méninges sont éliminés. Le cerveau est pesé et transféré dans un mixer avec 0,7 mL de MEM (Annexe 1) par gramme de tissu. Le tout est homogénéisé puis centrifugé 40 minutes à 100000 g et à 4 °C. Le surnageant est collecté. La tubuline est assemblée en microtubules en ajoutant 25% de glycérol (v : v), de l'ATP 2,5 mM et en chauffant à 30 °C pendant 40 minutes. La solution est centrifugée sur un volume de MEM/Saccharose 50% p : v¹, à 100000 g et 30°C pendant 1h30. Le surnageant et le MEM/Saccharose 50% p : v sont éliminés, la paroi des tubes est essuyée. Les culots de microtubules sont dépolymérisés sur la glace 15 minutes, puis repris dans du MEM. La solution est alors stockée à -80°C. Cette tubuline qui a subi un assemblage et un désassemblage est appelée tubuline 1X.

La tubuline subit une seconde étape de purification par chromatographie sur phosphocellulose. Ce polymère acide retient les protéines associées aux microtubules (MAP), qui ont un point isoélectrique élevé. Cette tubuline est appelée PC-tubuline.

Tout d'abord, la phosphocellulose (P11, Whatman) est préparée selon les indications du fabricant. Puis elle est resuspendue dans du MEM et le pH est ajustée à 6,65 par ajout de soude.

Toutes les opérations sont ensuite réalisées en chambre froide. On utilise 1 mL de résine pour 3 mg de tubuline 1X, placée dans un Büchner. La résine est lavée par 3 volumes de MEM. Le tampon en excès est aspiré et la tubuline 1X est déposée sur la résine. Puis on ajoute environ 100 µL de MEM par mg de tubuline 1X. La solution éluée est collectée par fractions de 20 mL environ (pour une colonne de 300 mL). La concentration protéique est calculée à partir de l'absorbance à 280 nm. Les fractions où la concentration protéique est supérieure à 2 mg/mL sont regroupées. Le volume et la concentration sont mesurés. Du GTP 1 mM est ajouté pour éviter que la tubuline ne se dénature.

La solution est ensuite concentrée dans des concentrateurs de 15 mL dont le tamis a un seuil d'exclusion de 30 kDa (Centriprep 30, Amicon). Les concentrateurs sont centrifugés 2 à 3 fois 40 minutes à 650 g et à 4°C. Le tampon est éliminé à chaque fois, et on obtient finalement la solution concentrée de 5 à 10 fois.

¹ Nous avons récemment remplacé le MEM / saccharose par du PEM / glycérol 60% v : v. Les rendements sont environ 40 à 60% plus élevés, sans que la purification soit altérée.

La PC-tubuline ne peut pas être conservée dans du MEM. Elle est donc transférée dans du PEM (Annexe 1) par filtration sur Biogel P30 équilibré dans du PEM. La PC-tubuline subit ensuite un cycle d'assemblage - centrifugation - désassemblage (recyclage) afin de ne conserver que la tubuline compétente pour l'assemblage. Pour cela, la tubuline est incubée pendant 20 minutes dans du PEM, à 10 mg/mL et à 35°C, en présence de glycérol (30% v : v) et de GTP 1 mM. La tubuline s'assemble alors en microtubules. Puis la suspension est déposée sur un volume de PEM/glycérol 60% v : v, et centrifugée à 35°C et 200000 g pendant 45 minutes. Le liquide est aspiré et le culot de microtubules est rincé par du PEM. Les tubes sont placés sur glace pendant 15 minutes pour désassembler les microtubules. La tubuline est alors reprise dans du PEM. La concentration est mesurée et du GTP 1 mM est ajouté. La solution est répartie en fractions aliquotes de 300 à 500 µL. La tubuline est alors congelée dans l'azote liquide et stockée à -80°C.

II.2 Test de la PC-tubuline.

La pureté et l'activité d'assemblage de la PC-tubuline sont systématiquement testées. La pureté de la PC-tubuline est analysée par électrophorèse des protéines en conditions dénaturantes. L'activité de la PC-tubuline est examinée en réalisant un assemblage de PC-tubuline à 6 mg/mL dans du PEM, MgCl₂ 5 mM et à 35°C, suivie au spectrophotomètre (absorbance à 350 nm). L'absorbance maximale obtenue doit être supérieure ou égale à 1 (Pirollet *et al.*, 1987). Un exemple d'assemblage dans ces conditions est présenté dans la figure II-1.

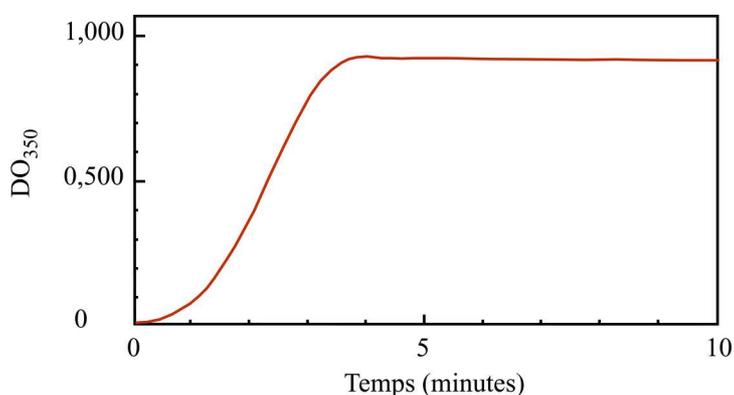


Figure II-1 : Test d'assemblage de la PC-tubuline. De la PC-tubuline (6 mg/mL) a été incubée à 35°C dans du PEM en présence de MgCl₂ 5 mM et de GTP 1 mM. L'assemblage de la tubuline en microtubules a été suivi par turbidimétrie (absorbance à 350 nm).

II.3 Filtration sur Biogel

Afin de changer le tampon dans lequel une protéine est en solution, on effectue une filtration sur gel de polyacrylamide. Le gel utilisé est le Biogel P30 (ou Biogel P6), constitué de billes de polyacrylamide dont le seuil d'exclusion est de 30 kDa (ou 6 kDa), en suspension dans un tampon. Dans ces conditions, les protéines de plus de 30 kDa restent à l'extérieur des billes, alors que les solutés de plus petite taille entrent dans les billes. L'éluat d'une colonne de Biogel P30 sera donc dans un premier temps constitué des protéines de plus de 30 kDa en solution dans le tampon dans lequel le Biogel P30 a été préparé. Les solutés de plus petite taille ne sont élués que dans un second temps puisqu'ils sont entrés dans les billes de Biogel P30. La procédure de filtration sur gel a été adaptée pour être rapide, et utilise une centrifugation.

Le Biogel P30 est mis en suspension dans un tampon (variable selon l'expérience) selon les indications du fournisseur (Bio-Rad) : le gel est laissé à gonfler pendant au moins 6 heures dans de l'eau bi-distillée. Puis le gel est placé dans un Büchner. L'eau est éliminée et le gel est resuspendu dans 3 volumes de tampon. Le tampon est éliminé, puis on recommence deux fois l'opération. Enfin, le Biogel est repris dans 2 à 3 volumes de tampon et peut être conservé plusieurs semaines à 4°C.

La filtration est réalisée dans des seringues de 1, 2, 5 ou 10 mL, dans lesquelles on dispose une pastille de Vion de diamètre adapté. Le volume mort de ces colonnes est le volume maximal de solution que l'on peut filtrer. Il vaut respectivement 200, 500, 1000 ou 2500 μ L. La seringue est remplie de Biogel P30. Puis le gel est tassé par centrifugation à 450 g et à 4°C pendant 5 minutes. La colonne est équilibrée en ajoutant un volume de tampon égal au volume mort et à nouveau centrifugation à 450 g et à 4°C pendant 5 minutes. Cette opération, effectuée deux fois permet d'obtenir une élution dans le volume désiré. Enfin, la solution à filtrer est déposée et elle est immédiatement éluee par centrifugation à 650 g et à 4°C pendant 5 minutes.

II.4 Préparation de tubuline-GTP

La tubuline est incubée 10 minutes à 4°C avec du GTP 500 μ M. La tubuline échange alors le GDP avec le GTP. Les nucléotides non liés sont ensuite éliminés par filtration sur Biogel P30 (seuil d'exclusion : 30 kDa). La résine de Biogel P30, équilibrée dans du tampon PEM (Annexe 1), est essorée par centrifugation cinq minutes à 430 g. Puis la solution (200 μ L/mL de résine) est déposée et éluee par centrifugation cinq minutes à 450 g. Si nécessaire, la tubuline est marquée avec du 8- 3 H]-GTP à raison de 100 μ Ci/ μ M de GTP et du $[\gamma$ - 32 P]-GTP à raison de 100 μ Ci/ μ M de GTP.

Un spectre d'absorption de 230 nm à 350 nm est réalisé. Un pic unique à 280 nm est obtenu : l'absence de pics à 260 nm et 350 nm révèle respectivement l'absence de nucléotides libres et d'agrégats.

II.5 Préparation de tubuline-GDP

La tubuline-GDP est le produit de désassemblage des microtubules. De la tubuline est incubée 30 minutes à 30°C en présence de GTP 1 mM, de MgCl₂ 5 mM et de glycérol 30% v : v. La tubuline s'assemble alors en microtubules. La suspension est ensuite centrifugée pendant 1 heure à 30°C et 100000 g sur un volume de coussin de PEM/glycérol 60% v : v. Le surnageant est éliminé soigneusement, puis le coussin de glycérol. Le culot est repris dans un volume minimal de tampon PEM. L'absence de nucléotide libre est vérifiée en réalisant un spectre d'absorbance de 230 nm à 350 nm.

II.6 Assemblage des microtubules à partir de tubuline-GTP

L'assemblage de la tubuline-GTP se produit en chauffant la solution à 35°C. Nous avons souhaité dans cette étude mesurer simultanément la concentration de tubuline polymérisée, la concentration de tubuline-GTP libre et la longueur des microtubules. Un élément essentiel est de mesurer ces paramètres dans des conditions absolument identiques, notamment en ce qui concerne la phase de réchauffement. Aussi, la solution de tubuline-GTP est incubée dans les mêmes conditions quel que soit le paramètre à mesurer. La solution de tubuline-GTP est répartie en fractions aliquotes de 20 µL dans des tubes en plastique de 5 mL. Le choix des tubes est essentiel, car il faut à la fois qu'ils résistent à la congélation dans l'azote liquide et que l'aliquote de 20 µL puisse être homogénéisée au vortex avec une solution de MEM/saccharose 50% p : v. Les aliquotes de tubuline-GTP (marquée à la fois par du 8-[³H]-GTP et du [γ -³²P]-GTP) peuvent être stockés dans l'azote liquide et doivent être décongelés à 4°C, juste avant utilisation. La réaction d'assemblage est déclenchée en plongeant les tubes dans un bain thermostaté à 35°C. La température s'équilibre en 30 secondes environ. Puis la réaction est arrêtée aux temps choisis. La méthode d'arrêt dépend du paramètre à mesurer. Toutes les mesures ont été réalisées trois fois.

II.6.1 Dosage sur filtre de la tubuline polymérisée

La réaction d'assemblage est arrêtée en ajoutant 1 mL de MEM/saccharose 50% p : v/glutaraldéhyde 0,75% v : v et homogénéisation ménagée au vortex. Les échantillons sont alors filtrés sur deux filtres Whatman GF/F équilibrés dans du MEM/ATP 2,5 mM. Les microtubules, marqués au 8-[³H]-GTP, sont retenus sur les filtres, alors que la tubuline libre est éliminée. Les filtres sont ensuite rincés deux fois par 4 mL de PEM/glycérol 25% v : v et transférés dans des fioles à scintillation pour compter la radioactivité. Les nucléotides radioactifs sont extraits des filtres en ajoutant 1,5 mL d'éthanol. L'extraction se fait pendant 15 minutes sous forte agitation. Puis 9 mL de liquide de scintillation Ready Safe (Beckman) sont ajoutés et le mélange est homogénéisé. La radioactivité est alors comptée 20 minutes (Compteur LS 6000SC Beckman). L'activité spécifique en cpm de tritium par µM de tubuline

est mesurée en double pour chaque série de mesures et permet de convertir la quantité de cpm de tritium en μM de tubuline assemblée.

II.6.2 Dosage de la tubuline-GTP

La réaction d'assemblage est arrêtée en plongeant l'échantillon dans l'azote liquide. Les échantillons sont ensuite décongelés à 4°C et mélangés avec $80\ \mu\text{L}$ de tampon PEM à 4°C . Une aliquote de $80\ \mu\text{L}$ est immédiatement déposée sur une colonne de $1\ \text{mL}$ de Biogel P30 équilibrée dans du tampon PEM essorée par centrifugation à $450\ \text{g}$ et à 4°C pendant 5 minutes. Puis la tubuline marquée au $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ est éluée par centrifugation à $600\ \text{g}$ et à 4°C pendant 5 minutes. Le $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ libéré par hydrolyse du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ est retenu sur la colonne. L'éluat est transféré quantitativement dans des fioles à scintillation par deux fois $1,5\ \text{mL}$ d'éthanol. On ajoute enfin $9\ \text{mL}$ de liquide à scintillation et la radioactivité en ^{32}P et ^3H est comptée par scintillation. La quantité de tritium reflète directement la quantité de tubuline et n'est pas affectée par l'hydrolyse du GTP en GDP. La quantité de ^{32}P peut donc être normalisée par rapport à la quantité de tritium. De cette façon, la variabilité des mesures induite par la filtration sur gel est éliminée. Le rapport $^{32}\text{P}/^3\text{H}$ avant assemblage correspond à la quantité de tubuline-GTP initiale et permet de convertir les rapports $^{32}\text{P}/^3\text{H}$ en concentration de tubuline-GTP en μM .

II.6.3 Détermination de la longueur et de la concentration des microtubules.

La réaction d'assemblage est arrêtée en ajoutant $1\ \text{mL}$ de MEM/saccharose $50\% \text{ p} : \text{v}$ /glutaraldéhyde $0,75\% \text{ v} : \text{v}$ et homogénéisation ménagée en retournant le tube 7 à 8 fois. Puis les suspensions de microtubules sont diluées 100 à 10000 fois dans du PEM/Glycérol $10\% \text{ v} : \text{v}$. Afin de ne pas casser les microtubules, les suspensions sont pipetées avec un cône coupé. Les microtubules sont ensuite centrifugés sur lamelles à $65000\ \text{g}$ dans un rotor de type *swing out* (TST 28.38-17 Kontron Instruments), pendant 30 minutes et à température ambiante. Les microtubules sont fixés 6 minutes à -20°C dans du méthanol à -20°C . Les lamelles sont alors lavées dans du PBS (Annexe 1) puis dans du PBS/Tween 20 $0,1\% \text{ v} : \text{v}$. Les lamelles sont ensuite incubées 30 minutes avec un anticorps monoclonal de souris anti- β -tubuline (produit au laboratoire) dilué au $1/100000$ dans du PBS/Tween 20 $0,1\% \text{ v} : \text{v}$. Les lamelles sont lavées trois fois dans du PBS/Tween 20 $0,1\% \text{ v} : \text{v}$, puis incubées 30 minutes avec un anticorps secondaire de chèvre anti-souris, couplé à la cyanine III (Jackson ImmunoResearch) dilué au $1/5000$ dans du PBS/Tween 20 $0,1\% \text{ v} : \text{v}$. Les lamelles sont lavées trois fois dans du PBS/Tween 20 $0,1\% \text{ v} : \text{v}$, puis montées sur lame dans un liquide de montage polymérisant, le Fluoromount (BDH Laboratory Supplies).

Les lamelles sont observées au microscope à fluorescence et des images de 6 à 12 champs non chevauchants sont réalisées avec une caméra CCD. Le grossissement

d'observation et le nombre de champs sont ajustés en fonction de la taille des microtubules et de la densité de microtubules pour pouvoir mesurer environ 300 microtubules. Deux types de logiciels ont été utilisés.

Le premier, semi-automatisé, a été mis en œuvre par Yves Usson (Laboratoire TIMC, UMR5525 CNRS, Institut Albert Boniot). Les images étaient dans un premier temps « seuillées » automatiquement et squelettisées. L'utilisateur pouvait alors intervenir pour résoudre les problèmes (croisements, microtubules en limite de champ...). Puis le programme renvoyait la liste des longueurs en μm .

Le second système utilise le matériel d'imagerie de l'U366. Les images sont acquises par une caméra CCD montée sur un microscope droit (Axioskop, Zeiss) grâce au programme IPLab. Les longueurs des microtubules sont ensuite mesurées grâce à l'outil de mesure de longueur d'IPLab après calibration avec une lame micrométrique.

Pour chaque mesure, un minimum de 6 champs a été exploité, et un minimum de 300 microtubules ont été mesurés. Dans quelques cas, en tout début d'assemblage, il n'a pas été possible de mesurer autant de microtubules. Par ailleurs, quand les microtubules sont très longs, ils risquent d'être cassés lors des manipulations. La longueur des microtubules ne peut donc être mesurée que jusqu'à une valeur limite. Ici, les longueurs n'ont pas été prises en compte si la longueur moyenne des microtubules excédait $60 \mu\text{m}$.

Pour calculer la concentration en nombre de microtubules, nous avons calculé le nombre de dimères de tubuline assemblés en microtubules par unité de volume, en multipliant la concentration de tubuline assemblée en microtubule par le nombre d'Avogadro. La concentration en nombre de microtubules par unité de volume a été calculée en divisant ce nombre de dimères de tubuline assemblés en microtubule par le nombre moyen de dimères de tubuline par microtubule. Ce nombre moyen de dimères de tubuline par microtubule a été calculé en considérant qu'il y a 1625 dimères de tubuline par micromètre de microtubule (Bayley *et al.*, 1994).

II.7 Analyse de l'activité nucléotide diphosphate kinase

La tubuline purifiée contient de façon variable une activité nucléotide diphosphate kinase qui catalyse la réaction $2 \text{GDP} \rightarrow \text{GTP} + \text{GMP}$. Il est donc possible que la quantité de GTP disponible au cours d'une réaction soit sous-estimée. Pour évaluer cette activité enzymatique contaminante, il suffit de doser la quantité de GMP formé au cours d'une réaction. Ce dosage est réalisé par mesure de l'absorbance à 260 nm après extraction des nucléotides et séparation par HPLC.

II.7.1 Purification des nucléotides

Le protocole a été adapté d'après O'Brien *et al.*, 1987. La tubuline-GTP (préparée comme indiquée ci-dessus) est assemblée dans des volumes de $200 \mu\text{L}$ à une concentration de

10,5 mg/mL. Aux temps choisis, la réaction est arrêtée par ajout de 100 μ L d'acide perchlorique 0,9 M à 4°C et homogénéisation au vortex. Les protéines sont ainsi précipitées pendant 5 minutes à 4°C, puis centrifugées 15 minutes à 15600 g et à 4°C. Le surnageant est récupéré et l'acide perchlorique en excès est précipité par ajout de 100 μ L d'acétate de potassium 4 M à 4°C pendant 5 minutes à 4°C. Le précipité est éliminé par centrifugation pendant 15 minutes à 15600 g et à 4°C. Le surnageant est récupéré et filtré sur filtre Millipore 0,45 μ m avant chromatographie par HPLC.

II.7.2 Séparation des nucléotides-phosphate par HPLC

La séparation des nucléotides phosphates (GMP, GDP et GTP) est réalisée par chromatographie en phase inverse et pairage d'ion (Lim, 1986; Perrett, 1986). Le protocole a été adapté d'après Michel *et al.*, 1989 et sur les conseils du Dr Jérôme Garin (Laboratoire DBMS/CP CEA Grenoble).

La colonne utilisée est une colonne C18 ODS2 150 x 4,6 mm équilibrée dans du tampon A (annexe 1), précédée d'une pré-colonne identique. Le débit est réglé sur 0,5 mL/minute. Les échantillons sont injectés et laissés 10 minutes pour adsorption sur la colonne et lavage avec un débit de 0,5 mL/minute. Les nucléotides sont ensuite élués par un gradient de tampon B (Annexe 1) : 0 à 65% de tampon B en 60 minutes. Les nucléotides sont élués en trois pics (GMP, puis GDP puis GTP) en 15 à 40 minutes. Enfin, la colonne est lavée pendant 15 minutes dans du tampon B 100%.

En sortie de colonne, l'absorbance à 260 nm est mesurée en continu et permet d'évaluer les quantités de nucléotides

II.8 Electrophorèse de protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Les protéines sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, selon leur poids moléculaire (Laemmli, 1970). Il existe une relation linéaire entre le logarithme des poids moléculaires des protéines et leur mobilité électrophorétique. Il est ainsi possible d'estimer le poids moléculaire apparent des protéines par comparaison avec des protéines de poids moléculaire connus (Combithek, Boehringer Mannheim).

Les échantillons sont additionnés de tampon de dépôt (Annexe 1) et portés à ébullition pendant 5 minutes. Le SDS, détergent fortement anionique, contenu dans le tampon de dépôt et la forte température dénaturent les protéines. le SDS en se liant tout le long de la chaîne polypeptidique, charge négativement les protéines, proportionnellement à leur taille. Le 2-mercaptoéthanol rompt les ponts disulfure des protéines. Après ébullition, les échantillons peuvent être conservés congelés.

Le gel d'électrophorèse est constitué d'un gel de concentration (3 à 5% de polyacrylamide, tableau II-1), au niveau duquel les protéines entrent dans le gel, puis d'un gel

de séparation (7 à 15% de polyacrylamide, tableau II-1, adapté dans chaque cas) au niveau duquel les protéines sont séparées.

Séparation	7,5%	8%	10%	12%	15%	18%
Eau	2320	2240	1910	1570	1070	570
Solution 2	1250	1250	1250	1250	1250	1250
Solution 1	1260	1340	1670	2010	2510	3010
Glycérol 50%	100	100	100	100	100	100
Solution 3	50	50	50	50	50	50
Temed	3	3	3	3	3	3
Solution 6	30	30	30	30	30	30
Concentration	3%			5%		
Eau	2200			1970		
Solution 4	875			875		
Solution A	350			582		
Solution 3	35			35		
Temed	3,5			3,5		
Solution 6	35			35		

Tableau II-1: Composition des gels de séparation et de concentration pour l'électrophorèse des protéines en conditions dénaturantes. La composition des différentes solutions est donnée dans l'annexe 1. Tous les volumes sont en microlitres.

La séparation des protéines se fait par migration dans un champ électrique en appliquant une tension de 180 V aux extrémités du gel (Mini Protean II Bio-Rad, 80 x 80 x 0,75 mm), immergé dans un tampon de migration (Annexe 1). La migration est stoppée lorsque le front de migration (matérialisé par le bleu de bromophénol) arrive en bout de gel. Le gel peut alors être coloré pour révéler les protéines ou utilisé pour un électrotransfert des protéines sur membrane de nitrocellulose (technique de *western*).

Les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie. Le gel est tout d'abord rincé à l'eau désionisée pour éliminer l'excès de SDS, puis les protéines sont fixées 20 minutes dans un mélange eau/éthanol 50%/Acide acétique 10%. Le gel est alors lavé dans de l'eau (deux fois 15 minutes) et incubé 1 heure dans du colorant Coomassie stain solution (Bio-Rad). L'excès de colorant est éliminé par lavage deux fois 20 minutes dans du décolorant Coomassie G250 destain solution (Bio-Rad).

Le gel peut alors être séché pour être conservé ou bien utilisé pour identifier des protéines par analyse des cartes peptidiques.

II.9 Electrotransfert

L'électrotransfert des protéines séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide est réalisé selon la méthode de Towbin *et al.*, 1979. Le transfert est effectué pendant 1 heure à 100 V dans du tampon de transfert (Annexe 1), dans un Mini Transblot (Bio-Rad).

Le transfert sur la membrane de nitrocellulose est vérifié par coloration réversible des protéines dans du rouge Ponceau S 0,2%/acide trichloroacétique 3%. Cette coloration est éliminée par lavage dans de l'eau distillée.

II.10 Détection immunologique des protéines transférées sur membrane de nitrocellulose

La membrane est incubée 30 minutes à température ambiante dans du PBS/Tween 20 0,1% (v : v). Puis la membrane est incubée 1 heure avec l'anticorps primaire, dirigé contre la protéine d'intérêt, dilué dans du PBS/Tween 20 0,1% (v : v). Pour chaque anticorps utilisé, la dilution est précisée dans la partie résultat et regroupée dans l'annexe 2. La membrane est ensuite lavée trois fois 10 minutes dans du PBS/Tween 20 0,1% (v : v).

La membrane est ensuite incubée 30 minutes à température ambiante avec l'anticorps secondaire, dirigé contre l'anticorps primaire et couplé à la peroxydase de raifort et dilué dans du PBS/Tween 20 0,1% (v : v). Puis la membrane est lavée trois fois 10 minutes dans du PBS/Tween 20 0,1% (v : v).

L'anticorps secondaire est révélé grâce au kit ECL (Enhanced Chemi-Luminescence, Amersham). Dans ce kit, la peroxydase catalyse l'oxydation du luminol en présence d' H_2O_2 . Le luminol retourne ensuite à son état réduit en émettant une lumière détectée sur un film photographique. La membrane est incubée 1 minute dans le mélange réactionnel fourni dans le kit. La membrane est enveloppée dans un film plastique et placée au contact d'un film photographique dans une cassette d'autoradiographie. Le film est ensuite révélé et fixé (produits Kodak).

II.11 Tyrosination de la tubuline

La tubuline est incubée 30 minutes à 30°C avec la tubuline tyrosine ligase (TTL), dans les conditions suivantes:

PC-tubuline	5 mg.mL ⁻¹
Tyrosine	0,1 mM
DTT	5 mM
ATP	5 mM
MgCl ₂	25 mM
KCl	100 mM
TTL	120 ng.mL ⁻¹

Puis le produit de réaction est refroidi sur glace puis centrifugé 10 minutes à 200000 g et à 4°C. La tubuline est ensuite filtrée sur Biogel P30 équilibré dans du PEM.

II.12 Purification de partenaires de la tubuline par colonne d'affinité

II.12.1 Extraits tissulaires et cellulaires

II.12.1.1 Production d'extraits de cerveaux de rat

II.12.1.1.1 Extraits totaux

Des rats mâles Sprague-Dawley âgés de 5 semaines environ sont sacrifiés puis décapités. Le cerveau est extrait et homogénéisé au Potter dans du tampon PEM additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete, EDTA-free, Boehringer Mannheim) à raison de 0,75 mL/g de cerveau. L'homogénéisation est réalisée à 1000 tours/minute en faisant monter et descendre le piston 8 fois à travers l'homogénat. L'homogénat est alors centrifugé 20 minutes à 4°C et à 200000 g. Le surnageant est collecté, additionné de 10% de glycérol (v : v), congelé dans l'azote liquide et conservé à -80°C.

II.12.1.1.2 Extraits appauvris en tubuline et protéines associées aux microtubules (MAP)

Les extraits précédents sont riches en tubuline (environ 20% des protéines totales) et en MAP. Pour éliminer les protéines se liant préférentiellement aux microtubules, les extraits totaux sont soumis à un cycle de polymérisation/dépolymérisation. Les extraits sont additionnés de Paclitaxel 20 µM, MgCl₂ 5 mM, GTP 1 mM et incubés 30 minutes à 37°C. Puis les microtubules formés et les MAP sont éliminés par centrifugation pendant 45 minutes à 20°C et 55000 g. Le surnageant est collecté et congelé et stocké dans l'azote liquide.

II.12.1.2 Production d'extraits de cellules HeLa

Des cellules HeLa sont cultivées en suspension dans du milieu « S-MEM modifié d'après Jodlik » (GIBCO BRL) jusqu'à une densité de $2,5 \cdot 10^6$ cellules/mL. La suspension de cellules est centrifugée 5 minutes à 325 g et à 20°C. Le milieu est éliminé et les cellules sont reprises dans du PBS glacé. La suspension est à nouveau centrifugée 5 minutes à 325 g et à 4°C. Le culot est repris dans environ un volume de tampon PEM/inhibiteurs de protéases/Triton 0,5% v : v. La suspension est ensuite centrifugée 15 minutes à 200000 g et à 4°C. Le surnageant est collecté, additionné de glycérol 10% v : v et congelé et stocké dans l'azote liquide. Comme les extraits de cerveau de rat, les extraits de cellules HeLa peuvent être appauvris en protéines associées aux microtubules. Le protocole est identique pour les deux types d'extraits.

II.12.2 Chromatographie d'affinité

L'anticorps YL1/2 est un anticorps de souris dirigé contre le peptide constitué des 17 acides aminés carboxyterminaux de la tubuline α de levure. Chez la levure, l'acide aminé carboxyterminal est une phénylalanine, et non une tyrosine comme chez les animaux. Toutefois, cet anticorps reconnaît le peptide homologue des animaux, et permet de discriminer la tubuline α tyrosinée ou non. La séquence du peptide chez la souris est :

Nt-Val-Glu-Gly-Glu-Gly-Glu-Glu-Glu-Gly-Glu-Glu-Tyr-Ct

Son masse molaire est de 1355,3 kDa.

II.12.2.1 Purification des immunoglobulines à partir de liquides d'ascites

La technique utilisée est celle décrite par McKinney et Parkinson, 1987. Le principe est de précipiter les protéines autres que les immunoglobulines par l'acide caprylique, puis de précipiter les immunoglobulines par du sulfate d'ammonium. Au cours des manipulations, il est important d'éviter les variations rapides de pH, qui abaissent fortement le rendement.

La précipitation par l'acide caprylique est réalisée à température ambiante. Le liquide d'ascite (obtenu auprès de la société Biotem) est dilué dans 4 volumes de tampon acétate (Annexe 1), et le pH est ajusté lentement à 4,5 par de la soude (1 M puis 0,1 M). On ajoute alors l'acide caprylique à raison de 25 μ L par mL de liquide d'ascite dilué, par petits volumes et sous agitation. L'agitation est poursuivie pendant 30 minutes, puis la solution est centrifugée 30 minutes à 10000 g à température ambiante. Le surnageant est filtré sur papier Wathman. On ajoute du PBS concentré 10 fois à raison de 1/10^{ème} du volume (il est alors à sa concentration normale), et le pH est ajusté à 7,4 par de la soude 5 M (jusqu'à pH=6) puis par de la soude 1 M. Le mélange est refroidi sur glace.

La suite des manipulations est réalisée à 4°C. Les protéines sont précipitées au sulfate d'ammonium, en atteignant 45% de saturation (Annexe 3, 0,277 g/mL) en 20 minutes sous agitation. L'agitation est poursuivie pendant 30 minutes, puis la solution est centrifugée 15 minutes à 5000 g et à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans un volume minimal de PBS (environ 1/10^{ème} du volume initial de liquide d'ascite). Le sulfate d'ammonium restant est éliminé par dialyse pendant une nuit contre 50 à 100 volumes de PBS. Les immunoglobulines ainsi purifiées sont alors stockées à -80°C en fractions aliquotes.

II.12.2.2 Couplage de l'anticorps YL1/2 à la Sépharose-4B

La méthode utilisée est celle décrite par Cuatrecasas, 1970. Dans un premier temps, on fait réagir du CNBr sur de la Sépharose 4B, puis l'anticorps réagit avec le CNBr fixé sur la résine.

II.12.2.2.1 Activation de la Sépharose 4B par le bromure de cyanogène

Cette technique est dangereuse, puisque le CNBr peut dégager de l'acide cyanhydrique très toxique. Elle est donc réalisée sous hotte. Un volume de Sépharose 4B est mis en suspension dans un volume d'eau, et placé dans un Bêcher sous agitation et avec un pH-mètre pour suivre en continu l'évolution du pH. Du bromure de cyanogène (1 g par mL de résine) est ajouté progressivement. Le pH diminue immédiatement et doit être maintenu à 11 par addition continue de soude 2 M (en dessous de pH=9, de l'acide cyanhydrique est libéré). Quand le pH cesse de décroître (environ 15 minutes), la résine est transférée sur Büchner. Elle est lavée par 15 volumes d'eau glacée, puis 300 volumes de tampon C (Annexe 1).

II.12.2.2.2 Couplage de l'anticorps à la Sépharose 4B

Un volume de résine (typiquement 2 mL) est mis en suspension dans un volume de tampon C contenant l'anticorps à coupler à une concentration de 5 mg/mL. La suspension est placée sous agitation pendant 2 heures à température ambiante, puis elle est transférée sur Büchner. La résine est rincée par 5 fois un volume de tampon C puis 5 volumes de tampon C. Le filtrat est recueilli à chaque fois pour vérifier qu'il n'y a pas de protéine libre et que le couplage a été total. Le CNBr qui n'aurait pas réagi est ensuite neutralisé par traitement pendant 2 heures à température ambiante dans du Tris 0,1 M (pH=8, ajusté par HCl 5 M). La résine est enfin lavée par 3 fois 5 volumes de tampon C, puis par 5 volumes du tampon souhaité pour le stockage. Ici, la résine est stockée dans du PEM/azide 0,02% p : v.

II.12.2.3 Préparation de la colonne

Des colonnes (en général 300 μ L) de Sépharose 4B couplée à l'anticorps YL1/2 sont préparées, puis lavées par 10 volumes de PEM. Puis une solution de tubuline tyrosinée (5 mg/mL) est déposée pour obtenir 2 mg de tubuline par mL de résine. Puis la colonne est lavée par 20 volumes de PEM/NaCl 0,1 M et rééquilibrée en PEM par 5 volumes de PEM.

II.12.2.4 Chromatographie

Des extraits cellulaires ou tissulaires sont déposés (environ 1,8 mL pour 300 μ L de résine) en laissant un temps de contact de 3 minutes par volume de colonne. Puis la colonne est lavée par 40 volumes de PEM. La tubuline est ensuite éluée par 10 volumes de PEM/peptide 0,1 mg/mL. La colonne est enfin lavée par 10 volumes de PEM/urée 6 M.

Les fractions (un volume de colonne) sont immédiatement stockées dans l'azote liquide. Elles sont ultérieurement décongelées dans du tampon de dépôt d'électrophorèse et bouillies 5 minutes pour analyse par électrophorèse SDS-PAGE ou utilisées telles qu'elles pour d'autres tests.

II.13 Phosphorylation des partenaires de la tubuline par cdc2

Les fractions à étudier sont incubées avec de l'ATP 1 μM , du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 80 $\mu\text{Ci/mL}$, du MgCl_2 100 μM et la kinase cdc2 purifiée à partir d'étoile de mer à 20 pmoles/minute par mL de milieu réactionnel (fournie par le Pr. Marcel Dorée - CNRS UPR1086 à Montpellier), pendant 15 minutes à température ambiante. La réaction est arrêtée en pipetant le volume de la réaction (12,5 μL) dans 3,1 μL de tampon de dépôt et chauffage à 100°C pendant 5 minutes. L'échantillon est alors prêt à être déposé pour analyse par électrophorèse SDS-PAGE et autoradiographie.

II.14 Etablissement de cartes peptidiques par spectrométrie de masse

Les protéines séparées par gel d'électrophorèse peuvent être identifiées par analyse de cartes peptidiques. Le principe est de prélever la bande électrophorétique à étudier, de couper les protéines contenues dans le fragment de gel par une protéase et de mesurer par spectrométrie de masse la taille des peptides libérés. Les protéases comme la trypsine ou la chymotrypsine ne coupent les protéines qu'en des sites spécifiques. La trypsine par exemple coupe la liaison peptidique située en C-terminal des acides aminés aromatiques. Connaissant la séquence d'une protéine, la taille des peptides libérée par protéolyse peut donc être prédite. Le logiciel PeptideSearch² de l'EMBL (ou le logiciel MOWSE en Grande Bretagne³) permet de comparer la liste des tailles des peptides obtenus par spectrométrie de masse et la liste des tailles de peptides attendues pour l'ensemble des protéines répertoriées dans les bases de données (bases de données protéiques comme SwissProt⁴).

Il existe des limitations à cette méthode. La première peut être évitée par une manipulation soigneuse. Le gel peut en effet être contaminé par des fragments de peau ou de cheveux du manipulateur. La liste de masses obtenue permet d'identifier la kératine du manipulateur ! Les autres limitations nécessitent un travail d'interprétation. Tout d'abord, la digestion peut ne pas être totale et on obtient alors des peptides plus grands que ceux attendus. Le logiciel peut être paramétré pour en tenir compte. Ensuite, tous les peptides ne sont pas détectés par spectrométrie de masse : ils peuvent rester piégés dans le gel par exemple. On peut ainsi n'avoir qu'un tiers de la protéine couverte par les différents peptides. De plus, pour une même liste de masses peptidiques, plusieurs protéines peuvent être trouvées dans une base de donnée. L'identification n'est alors possible qu'en utilisant des paramètres indépendants : poids moléculaire obtenu lors de l'électrophorèse, valeur du point isoélectrique, tissu d'origine...

² <http://www.mann.embl-heidelberg.de/Services/PeptideSearch/PeptideSearchIntro.html>

³ <http://srs.hgmp.mrc.ac.uk/cgi-bin/mowse>

⁴ <http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>

II.14.1 Préparation des bandelettes d'électrophorèse

Les bandes de protéines colorées au bleu de Coomassie (Bio-Rad) sont découpées au plus juste sous loupe binoculaire pour obtenir le plus de protéine possible dans le plus petit volume de gel. Les bandelettes sont lavées sous forte agitation pendant 20 minutes dans 1 mL de NH_4HCO_3 100 mM pH=8,3, puis 20 minutes dans 1 mL d'eau/acétonitrile 50% v : v. Elles sont ensuite lavées sous forte agitation pendant 20 minutes dans 1 mL de NH_4HCO_3 20 mM pH=8,3, puis 20 minutes dans 1 mL d'eau/acétonitrile 50% v : v. Les bandelettes sont alors reprises dans 0,5 mL d'eau, découpées en 4 morceaux et transférées dans des tubes Eppendorf Biopur. L'eau est éliminée et les bandelettes sont séchées sous vide d'air 30 minutes au Speed Vac sans chauffage.

II.14.2 Digestion à la trypsine et analyse par spectrométrie de masse

Ces analyses ont été réalisées par le Dr Jérôme Garin (Laboratoire DBMS/CP CEA Grenoble). La procédure est décrite dans Garin *et al.*, 2001.

II.14.3 Analyse des cartes peptidiques par comparaison avec les bases de données (Logiciel Peptide Search de l'EMBL)

Le logiciel PeptideSearch de l'EMBL est utilisé en choisissant les paramètres suivant. Un exemple de formulaire de soumission en ligne est présenté dans la figure II-2.

II.15 Préparation et caractérisation d'oligomères pontés covalamment de tubuline

II.15.1 Préparation d'oligomères de tubuline pontés covalamment

Le protocole a été adapté d'après Koshland *et al.*, 1988 et consiste à ponter des microtubules par de l'éthylèneglycol-bis(succinimidylsuccinate) (EGS, Calbiochem), un agent qui réagit avec les groupements amines des protéines. De la tubuline (10 mg/mL final) est assemblée dans la solution B avec du GTP 1 mM, pendant 30 minutes à 37°C. Les microtubules subissent alors un pontage covalent modéré par de l'EGS 3,4 mM pendant 5 minutes à 37°C. Puis l'EGS est neutralisé par dilution dans 9 volumes de solution D, qui contient du glutamate. La neutralisation est réalisée pendant 1 heure à température ambiante. La solution est ensuite diluée une fois dans du PEM, et centrifugée pendant 1 heure à 200000 g à température ambiante. Le culot est repris dans un volume de PEM aussi faible que possible et congelé à -80°C. Cette solution contient des oligomères de tubuline (cf. chapitre 3). Avant utilisation, la solution d'oligomères de tubuline est diluée dans du PEM et filtrée sur filtres Millipore 0,1 μm . Les oligomères sont à nouveau centrifugés et repris en solution dans du PEM. Cette étape permet d'éliminer les agrégats de tubuline dénaturée, qui sont de grande taille.

a

Protein mass range [kDa]:	0	< Mr <	300
Cleavage agent:	Trypsin		
Number of peptides required for protein match:	5		
Number of missed cleavage sites per peptide:	1		
Peptide mass accuracy:	0.1	Da	using Monoisotopic mass
Peptide charge state:	Protonated (MH+)		
<input checked="" type="checkbox"/> Oxidized Methionine	Cysteine is: Cys		
Peptide masses:	On each result page show this number of matches: 30 Start PeptideSearch Reset form		
745.4311 752.4110 797.3966 839.1514 929.8979 982.4935 1091.6398 1116.7359			

b

EMBL Protein & Peptide Group

PeptideSearch results

Search parameters

Protein mass range	0-300 kDa
Cleavage agent	Trypsin
Peptide mass accuracy	0.1 Da
Methionine is	Oxidized
Cysteine is	Cys
Peptide charge state	Protonated
Number of peptides required for match	5
Number of uncleaved sites	1
Number of peptides used in search	23

Peptide masses used in the search

Masses are monoisotopic

745.4311	752.411	797.3966	839.1514	929.8979	982.4935	1091.6398	1116.7359
1199.7238	1232.6318	1260.6841	1278.8252	1307.6915	1320.7267	1345.6921	1513.7327
1627.9873	1683.8895	1716.2595	1829.0047	1887.8467	1951.9813	2023.3943	

Date: 3/30/01
 Time: 11:34:06 AM+01:00
 Database: nrdb.index(05Mar2001)
 213.203.64.125
 261 matches

Search result

261 matches were found. Showing matches 1 through 30.

Peptides matched	Mass [kDa]	Database accession	Protein Name	Digest	2nd pass search
<input type="button" value="sort"/>	<input type="button" value="sort"/>	<input type="button" value="sort"/>	<input type="button" value="sort"/>		
10	74.47	swissprot:P16474	GR78_YEAST 78 KDA GLUCOSE-REGUL	☺	⇅
8	286.53	sptrembl:Q9NCW7	AF174134 AF174134_3_gene: "nud"	☺	⇅
8	229.00	sptrembl:Q25662	Q25662 REPEAT ORGANELLAR PROTEI	☺	⇅
7	281.75	sptrembl:Q21408	Q21408 SIMILARITY TO VERTEBRATE	☺	⇅

Figure II-2 : Formulaire de saisie du logiciel Peptide Search et exemple de résultats. (a) Les paramètres à indiquer sont : la gamme des tailles de protéines à explorer, l'enzyme utilisée, la liste des masses des peptides après digestion. Les cystéines sont considérées comme natives mais les méthionines comme oxydées. L'hydrolyse peut être partielle, et certains sites de coupures peuvent ne pas avoir été utilisés. On examine donc dans les banques de données les peptides qui seraient générés par une protéolyse partielle avec un site de coupure non utilisé. Les résultats sont considérés comme significatifs seulement si la liste des masses des peptides fournies et celles de la banque ont un nombre minimum de masses communes. Ce minimum est fixé à 5, mais pour les protéines de masses molaires élevées (> 200 kDa) dont l'hydrolyse génère un grand nombre de peptides, ce minimum est relevé à 7 voire 10. **(b)** Exemple de résultats. Le logiciel renvoie la liste des protéines par nombre croissant de masses de peptides communes entre les données expérimentales et la banque. Il indique également la masse molaire de la

chaque protéine, le code de la séquence dans les bases de données et enfin le nom de la protéine. Il donne également la possibilité d'examiner la liste de tous les peptides possibles pour chacune des protéines, ainsi que de croiser l'analyse avec les résultats de la digestion par une seconde enzyme.

La qualité des préparations est vérifiée en testant l'activité de nucléation (voir résultats chapitre 3). De plus, l'absence de gros agrégats est vérifiée par immunofluorescence indirecte sur lamelles, en utilisant le protocole décrit pour les mesures de longueurs des microtubules.

II.15.2 Mesures de liaison entre les oligomères de tubuline et le GTP

La capacité de liaison de nucléotides comme le GTP par les oligomères de tubuline a été étudiée en réalisant un diagramme de Scatchard. Pour cela, les quantités de nucléotide lié et libre ont été mesurées, pour des concentrations variables de nucléotide, et pour une quantité constante d'oligomères.

Les oligomères (1 mg/mL) sont incubés avec du GTP et du [γ - 32 P]-GTP, en quantités variables (indiquée pour chaque expérience), pendant 15 minutes à 4°C. La concentration protéique est mesurée par la méthode de Bradford (kit Bio-Rad Protein Assay) sur une fraction de 15 μ L (en double), et la radioactivité est comptée par scintillation sur une fraction de 15 μ L (liquide de scintillation Ready Safe Beckman, compteur LSC6500 Beckman, en double). La radioactivité spécifique par mol.L⁻¹ de GTP est ainsi mesurée. Puis, 180 μ L du mélange sont filtrés sur Biogel P30. Le volume de l'éluat est mesuré par pesée. La concentration protéique et la quantité de radioactivité sont mesurées comme précédemment, sur des fractions de 15 μ L. La radioactivité éluée correspond au nucléotide lié aux oligomères.

Le rendement de la filtration sur gel est calculé en % de protéine éluée et la quantité de radioactivité éluée est corrigée par ce rendement. Connaissant la radioactivité spécifique par mol.L⁻¹ de GTP, la quantité de radioactivité est convertie en concentration de GTP lié aux oligomères.

Connaissant la concentration de GTP totale et la concentration de GTP lié aux oligomères, on déduit la quantité de GTP libre. On peut alors construire un diagramme de Scatchard, donnant les paramètres de la liaison.

II.15.3 Caractérisation des oligomères de tubuline par diffusion de lumière

II.15.3.1 Introduction à la diffusion de lumière

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Dr Eric Buhler (CERMAV CNRS). La diffusion de lumière est une méthode très utilisée pour étudier la dynamique et la structure des solutions macromoléculaires et colloïdales. Par les échelles qui lui sont accessibles (de 1 nm à 1 μ m environ), cette méthode est complémentaire de la diffusion des neutrons et des

rayons X. Les particules ou molécules en suspension diffusent le rayonnement incident en fonction de leurs propriétés électroniques. Le champ électrique associé à une onde électromagnétique est modifié lors de cette interaction. On distingue deux grands types d'expériences de diffusion de rayonnement, de la lumière en particulier.

La diffusion dynamique ou quasi-élastique de la lumière permet d'étudier les propriétés dynamiques et viscoélastiques des solutions. On mesure l'intensité diffusée dans une direction donnée au cours du temps, puis on calcule la fonction d'auto corrélation de cette intensité. De la fonction d'auto corrélation, on peut extraire des temps de relaxation qui permettent de calculer les coefficients de diffusion des particules étudiées.

La diffusion élastique ou statique permet, par mesure de l'intensité diffusée dans différentes directions, de déterminer les facteurs de structure et de forme des particules étudiées. La diffusion élastique permet aussi de mesurer la masse, la forme et la taille de ces particules. On peut également obtenir un coefficient de Viriel, qui renseigne sur les interactions moléculaires. En pratique, les solutions étudiées ici sont suffisamment diluées pour que les interactions moléculaires soient négligeables.

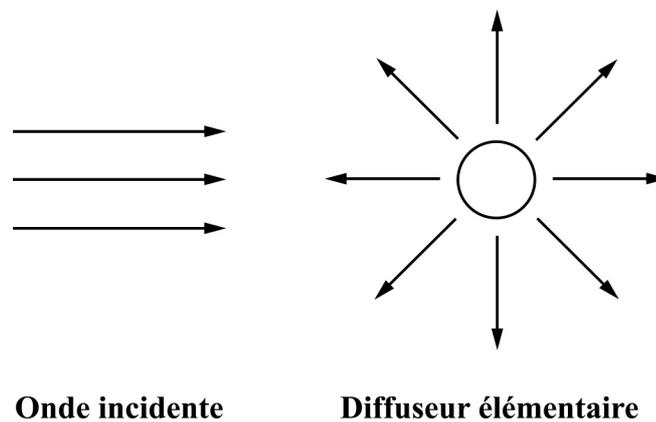


Figure II-3 : Principe de la diffusion de lumière. Une onde incidente est diffusée dans toutes les directions par un diffuseur élémentaire. Un diffuseur élémentaire, qui d'une taille de l'ordre de q^{-1} (voir le texte) diffuse l'onde incidente selon ses caractéristiques structurales et dynamiques.

L'expérience de diffusion de rayonnement consiste à envoyer un faisceau incident monochromatique sur l'échantillon à étudier et à analyser le rayonnement diffusé dans toutes les directions (Figure II-3). Les diffuseurs élémentaires sont de petite taille par rapport à la longueur d'onde incidente, si bien que le rayonnement est diffusé de manière isotrope par les diffuseurs élémentaires. Une macromolécule par exemple, est constituée de diffuseurs élémentaires de la taille du monomère. Les vecteurs d'onde incidents et diffusés dépendent de l'indice de réfraction du milieu (n) et sont inversement proportionnels aux longueurs d'onde incidente (λ_i) et diffusée (λ_d). Dans le cas de la diffusion élastique de la lumière, il n'y a pas de transfert d'énergie lors de la diffusion : les longueurs d'onde incidente et diffusée sont

égales. Ainsi les modules des vecteurs d'onde incident et diffusé sont égaux, quelle que soit la direction d'observation (Figure II-4).

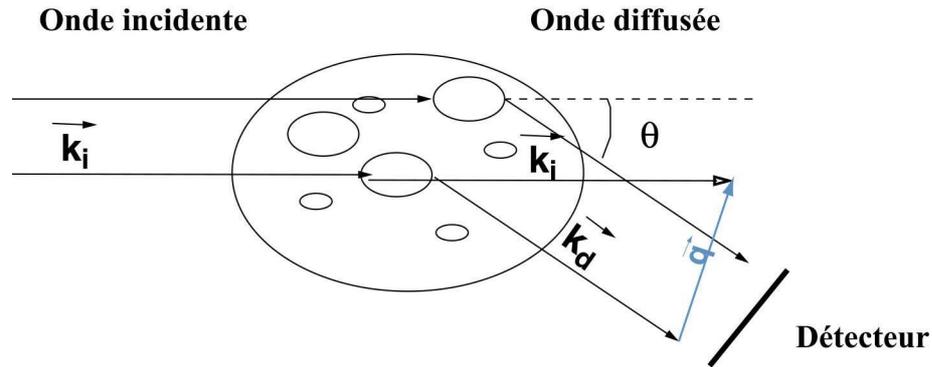


Figure II-4 : Principe de la diffusion de lumière et définition du vecteur q .

La différence entre les vecteurs incident et diffusé dans la direction θ (vecteur \vec{q}) a pour module :

$$|\vec{q}| = \frac{4\pi n}{\lambda_i} \sin \frac{\theta}{2}$$

L'inverse du module du vecteur \vec{q} , q^{-1} , est homogène à une longueur et définit l'échelle d'observation du système. On peut observer des éléments plus petits que q^{-1} , et jusqu'à des tailles 2 à 3 fois plus grandes. Dans le cas de la diffusion de lumière, l'angle θ peut varier de 15° à 150° . Pour l'appareil du CERMAV qui utilise comme source de lumière un laser à argon, la longueur d'onde est fixée à 488 nm. L'indice de réfraction d'une solution aqueuse diluée est de 1,34. Ainsi, q^{-1} varie de 30 à 230 nm selon l'angle d'observation.

Lors d'une expérience de diffusion de lumière, on mesure l'intensité diffusée dans une direction donnée. Cette intensité est égale au carré du module du champ électrique associé à l'onde diffusée. Or ce champ électrique diffusé est le résultat de l'interaction entre le champ électrique incident et les N diffuseurs élémentaires présents dans le volume de solution étudié. Le champ électrique diffusé, \vec{E}_d s'écrit alors :

$$\vec{E}_d(q, t) = \sum_{i=1}^N a_i \cdot e^{(i \cdot \vec{q} \cdot \vec{r}_i(t))} \cdot e^{-i\omega t}$$

Dans cette équation, q est le module du vecteur \vec{q} , t le temps, N le nombre de diffuseurs élémentaires, a_i l'amplitude du champ diffusé par le $i^{\text{ème}}$ diffuseur et ω la fréquence de l'onde. Le vecteur $\vec{r}_i(t)$ décrit la position à l'instant t du $i^{\text{ème}}$ diffuseur. Le détecteur mesure l'intensité diffusée :

$$I(q) = \langle I(q, t) \rangle_T = \left\langle \left| \vec{E}_d(q, t) \right|^2 \right\rangle_T$$

Dans cette équation, $\langle X \rangle_T$ désigne la moyenne de X pendant la durée T . Des mesures de l'intensité diffusée, on peut extraire les facteurs de structure et les facteurs de forme de la solution. Le facteur de structure traduit les interactions entre les macromolécules de la solution et donne des informations sur la structure de la solution. Le facteur de forme traduit les interactions entre les diffuseurs élémentaires à l'intérieur des macromolécules. Il donne donc des informations sur la forme, la masse et la taille des macromolécules.

En pratique, l'intensité mesurée n'est pas obtenue de manière absolue. On compare en effet l'intensité diffusée par l'échantillon (I) à celle d'une référence (I_{ref}), mesurée dans les mêmes conditions et pour lequel le facteur de Rayleigh est connu. Le liquide de référence est le toluène ($R(q) = 40.10^{-6} \text{ cm}^{-1}$), et $R_{\text{eau}}/R_{\text{toluène}} = 0,115$ à 488 nm. On obtient alors $R(q)$ pour l'échantillon :

$$R(q) = \frac{I - I_{\text{solvant}}}{I_{\text{ref}}} \cdot \left(\frac{n_{\text{solvant}}}{n_{\text{ref}}} \right)^2 \cdot R_{\text{ref}}(q)$$

La masse molaire moyenne peut être obtenue en mesurant $R(q)$ à différents angles, et en extrapolant $R(q)$ à angle nul et à concentration nulle. Pour cela, on représente $K.c/R(q)$ en fonction de q^2 . Dans ce diagramme, l'ordonnée à l'origine est $1/M$ et la pente vaut $\langle R_G^2 \rangle / 3$, où R_G est le rayon de giration des particules.

Diffusion dynamique de la lumière. La diffusion dynamique de la lumière permet d'étudier le mouvement des particules en solution. Du fait de ce mouvement, la fréquence de la lumière incidente ω_i est modifiée de $\Delta\omega$. Comme le rapport $\Delta\omega/\omega_i$ est très faible ($\approx 10^{-12}$), la diffusion est dite quasi-élastique. L'intensité mesurée $I(t)$ est la somme des intensités diffusées par le solvant et par les particules subissant le mouvement brownien. $I(t)$ fluctue autour de sa valeur moyenne à cause du mouvement brownien des particules dans le volume diffusant. Des informations peuvent être obtenues à partir des fluctuations de $I(t)$ en calculant la fonction d'autocorrélation temporelle de l'intensité diffusée : $G(t) = \langle I(0).I(t) \rangle$. Quand $t \rightarrow \infty$, $G(\infty) \rightarrow \langle I \rangle^2$ et il n'y a pas de corrélation. Au contraire, si $t \rightarrow 0$, $G(0) \rightarrow \langle I^2 \rangle$ et la corrélation est maximale. Le mouvement brownien étant stochastique, la valeur de $G(t)$ décroît selon une exponentielle. Dans le cas de la diffusion de lumière, I dépend également de q . De plus, on utilise la fonction d'autocorrélation temporelle normée :

$$g(q, t) = \frac{\langle I(q, 0) \cdot I(q, t) \rangle}{\langle I(q, 0) \rangle^2}$$

Quand t varie de 0 à $+\infty$, $g(q, t)$ varie de 2 à 1, car $\langle I(0)^2 \rangle = 2 \cdot \langle I(0) \rangle^2$. Expérimentalement, $g(q, t)$ prend la forme :

$$g(q, t) = A \cdot \left[1 + \beta \cdot e^{-Dq^2 t} \right]$$

Dans cette équation, D est le coefficient de diffusion des particules de la loi de Fick. D peut donc s'écrire, d'après la loi de Fick : $D = 1/\tau q^2$ où τ est le temps de relaxation,

caractéristique de la diffusion des particules considérées. D dépend de q^2 et de la concentration en particules et peut être approché par une relation linéaire : $D_{q^2 \rightarrow 0} = D_0 \cdot (1 + k_D \cdot c)$, où D_0 est le coefficient de diffusion extrapolé à angle nul et concentration nulle. enfin, le coefficient de diffusion D_0 est relié au rayon hydrodynamique (R_H) des particules en solution par la loi de Stokes-Einstein :

$$D_0 = \frac{kT}{6\pi\eta_s R_H}$$

Dans cette équation, η_s est la viscosité du solvant (0,89 mPa.s à 25°C) et k la constante de Boltzman.

L'analyse de $g(q, t)$ est effectuée par des traitements mathématiques qui permettent de déceler la présence de plusieurs catégories de particules dans la solution. On peut alors obtenir le temps de relaxation et donc le rayon hydrodynamique de chaque particule. Cette analyse nécessite que les différentes particules soient de tailles suffisamment différentes.

II.15.3.2 Protocole expérimental

Les expériences de diffusion statique ou dynamique de la lumière ont été réalisées avec un spectromètre équipé d'un laser à argon (Spectra Physics modèle 2020) à $\lambda = 488$ nm, un corrélateur ALV-5000 (ALV, Langen-FRG Instruments), un système de détection à angle variable motorisé et contrôlé par ordinateur et une cellule thermostatée. La température est fixée à $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Le spectre est mesuré à travers un filtre monochromatique à 488 nm et un trou d'épingle de 200 μm ou 100 μm (précisé pour chaque expérience), avec un tube photomultiplicateur (ALV). Les échantillons sont placés dans des cuves cylindriques de quartz, plongées dans un bain thermostaté de toluène (25°C sauf indication contraire).

**Chapitre III : Facteurs
limitant la dynamique
d'assemblage des
microtubules**

III Réévaluation des facteurs contrôlant la dynamique d'assemblage des microtubules

Nous avons voulu étudier la cinétique d'assemblage des microtubules dans un système expérimental simple et bien défini, et déterminer les facteurs qui limitent la réaction d'assemblage et désassemblage des microtubules. Nous avons donc assemblé de la tubuline-GTP pure, en absence de GTP libre. Dans ces conditions, une phase d'assemblage de la tubuline en microtubules et une phase de désassemblage net ont lieu successivement (Carlier *et al.*, 1997; Carlier et Pantaloni, 1978; O'Brien et Erickson, 1989). De plus, la concentration en tubuline-GTP peut être déterminée directement et précisément. La tubuline formant un complexe 1 : 1 avec le GTP (Carlier et Pantaloni, 1978; O'Brien et Erickson, 1989), la concentration en tubuline-GTP peut être suivie au cours du temps en mesurant directement la concentration de tubuline-GTP à chaque instant. Au contraire, dans les conditions expérimentales où il y a un excès de GTP ou un système régénérateur du GTP, la concentration en tubuline-GTP dépend des réactions qui permettent la formation de tubuline-GTP à partir de tubuline-GDP (Carlier *et al.*, 1997; Mandelkow *et al.*, 1988; Pirollet *et al.*, 1987).

III.1 Résultats

III.1.1 Système expérimental

De la tubuline-GTP à quatre concentrations initiales (60, 75, 105 et 150 μM) a été assemblée en microtubules à 35°C en absence de GTP libre. La concentration en tubuline-GTP et la concentration de tubuline assemblée en microtubules ont été mesurées au cours du temps. La concentration en nombre de microtubules, définie comme le nombre de microtubules par unité de volume et exprimée ici en pM, a été calculée quand cela était possible : longueur moyenne des microtubules inférieure à 60 μm (voir chapitre II).

Pour doser le GTP restant, la tubuline est incubée avec du GTP marqué radioactivement sur le phosphate γ par du ^{32}P . Ainsi, la tubuline-GDP n'est pas marquée radioactivement par le ^{32}P . Aux temps désirés, la réaction peut être stoppée. Le phosphate inorganique radiomarqué libéré par l'hydrolyse du GTP en GDP est éliminé au moyen d'une filtration sur gel. Ainsi, la quantité de ^{32}P restante est une mesure de la quantité de tubuline-GTP restant dans la solution. D'autre part, la tubuline assemblée en microtubule est liée à une molécule de GDP. Ce GDP n'est pas échangeable avec la solution. L'utilisation de GTP marqué au tritium sur le cycle de la guanine nous a permis de mesurer la quantité de tubuline assemblée en microtubule, ce marquage étant insensible à l'hydrolyse du GTP en GDP. Pour cela, les microtubules sont fixés par un agent pontant et retenus sur des filtres en fibres de

verre. Seule la tubuline assemblée en microtubules y est retenue. La quantité de radioactivité (due au GDP marqué) retenue sur filtre permet de doser la quantité de tubuline assemblée en microtubules. L'absence de GTP en excès est là encore un facteur important : le bruit de fond est en effet très faible dans ces conditions. Enfin, la distribution de longueurs des microtubules a été déterminée par immunofluorescence indirecte après centrifugation sur lamelles, quand cela était possible techniquement (longueur moyenne des microtubules inférieure à 60 μm).

Nous observons que la quantité maximale de tubuline assemblée augmente quand la concentration initiale en tubuline-GTP augmente (Figure III-1a-d). Quelle que soit la concentration initiale en tubuline-GTP, la transition entre les phases d'assemblage et de désassemblage se produit pour une concentration en tubuline-GTP de $30 \pm 5 \mu\text{M}$ (figure III-1e). Cette concentration est la concentration en tubuline-GTP en dessous de laquelle on n'observe pas d'assemblage : elle correspond à la concentration critique dans le tampon utilisé (Mitchison et Kirschner, 1984).

Nous avons voulu vérifier que la concentration critique est effectivement atteinte lors du maximum d'assemblage. Pour cela, de la tubuline-GTP (80 μM) sans excès de GTP a été assemblée en microtubules à 35°C. Le maximum d'assemblage est atteint après 8 minutes (figure III-2a). La réaction peut être stoppée en refroidissant rapidement la solution avant le maximum d'assemblage. Quand la solution est à nouveau portée à 35°C, un nouvel assemblage de tubuline en microtubules est observé (figure III-2b). Cet assemblage est plus lent et moins important que dans la figure III-2a car une partie de la tubuline-GTP a été consommée avant le refroidissement de la solution. Ainsi, jusqu'au maximum d'assemblage, la concentration en tubuline-GTP dans la solution est supérieure à la concentration critique. Au contraire, si la réaction d'assemblage est stoppée au moment du maximum d'assemblage (ou après), puis que la solution est réchauffée, il n'y a pas de nouvel assemblage (Figure III-2c). A partir du maximum d'assemblage, la concentration en tubuline-GTP dans la solution est donc inférieure à la concentration critique. La concentration de 30 μM de tubuline-GTP, atteinte lors de la transition entre les phases d'assemblage et de désassemblage (figure III-1e) est donc la concentration critique pour l'assemblage.

D'autre part, les vitesses d'assemblage et de désassemblage, ainsi que la vitesse d'hydrolyse du GTP augmentent fortement quand la concentration initiale en tubuline-GTP augmente (Figure III-1). Enfin, on peut remarquer que les courbes d'assemblage sont symétriques par rapport au maximum d'assemblage.

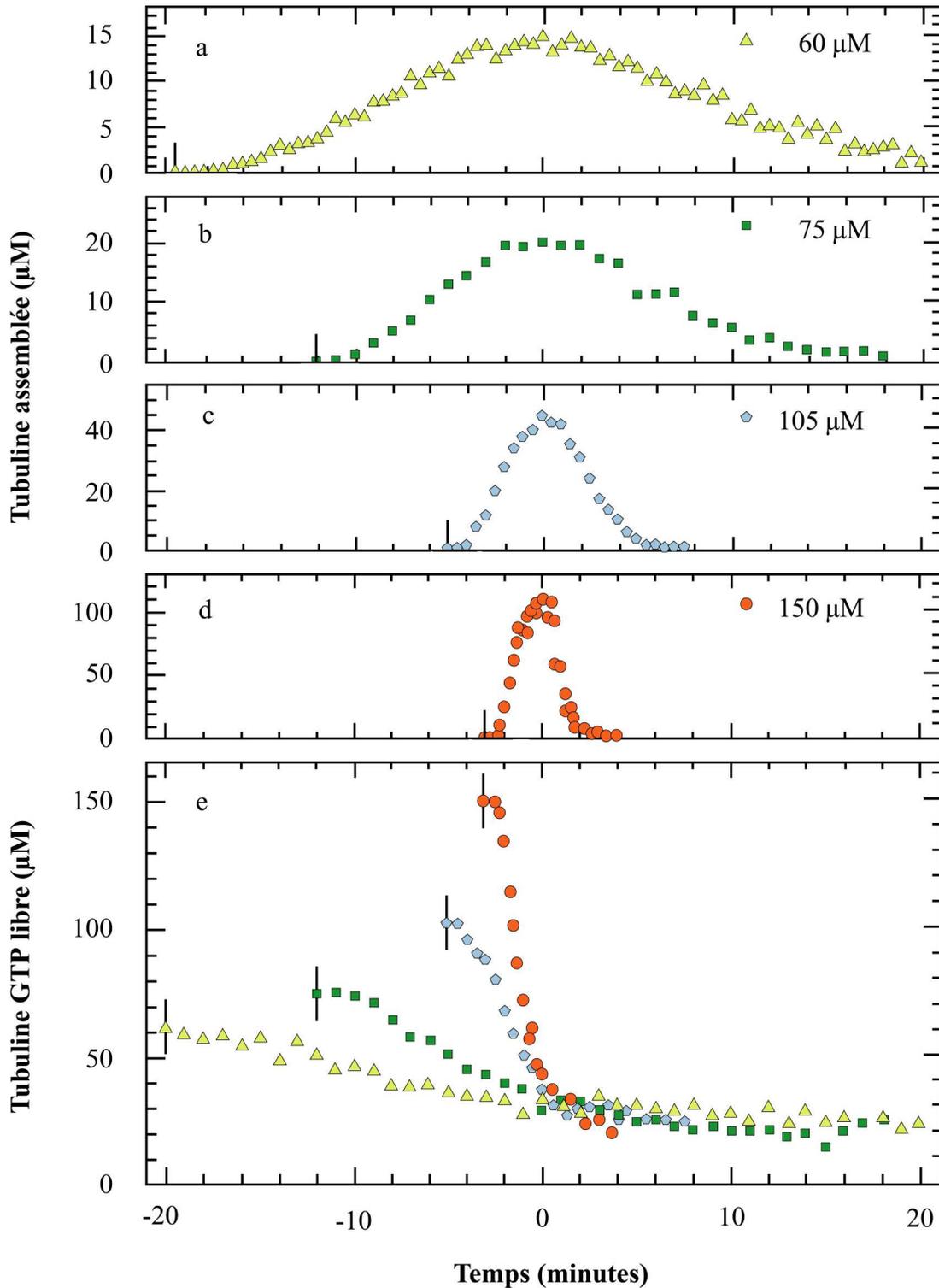


Figure III-1 : Assemblage de tubuline GTP. De la tubuline-GTP aux concentrations indiquées a été assemblée en microtubules par chauffage à 35°C, en absence de GTP libre. (a)–(d) : concentration de tubuline assemblée en microtubules au cours du temps. (e) : concentration en tubuline-GTP au cours du temps. Le temps 0 correspond au maximum d'assemblage et la barre verticale au début de chaque courbe indique le début de la réaction. Les échelles verticales sont différentes dans les différents graphes.

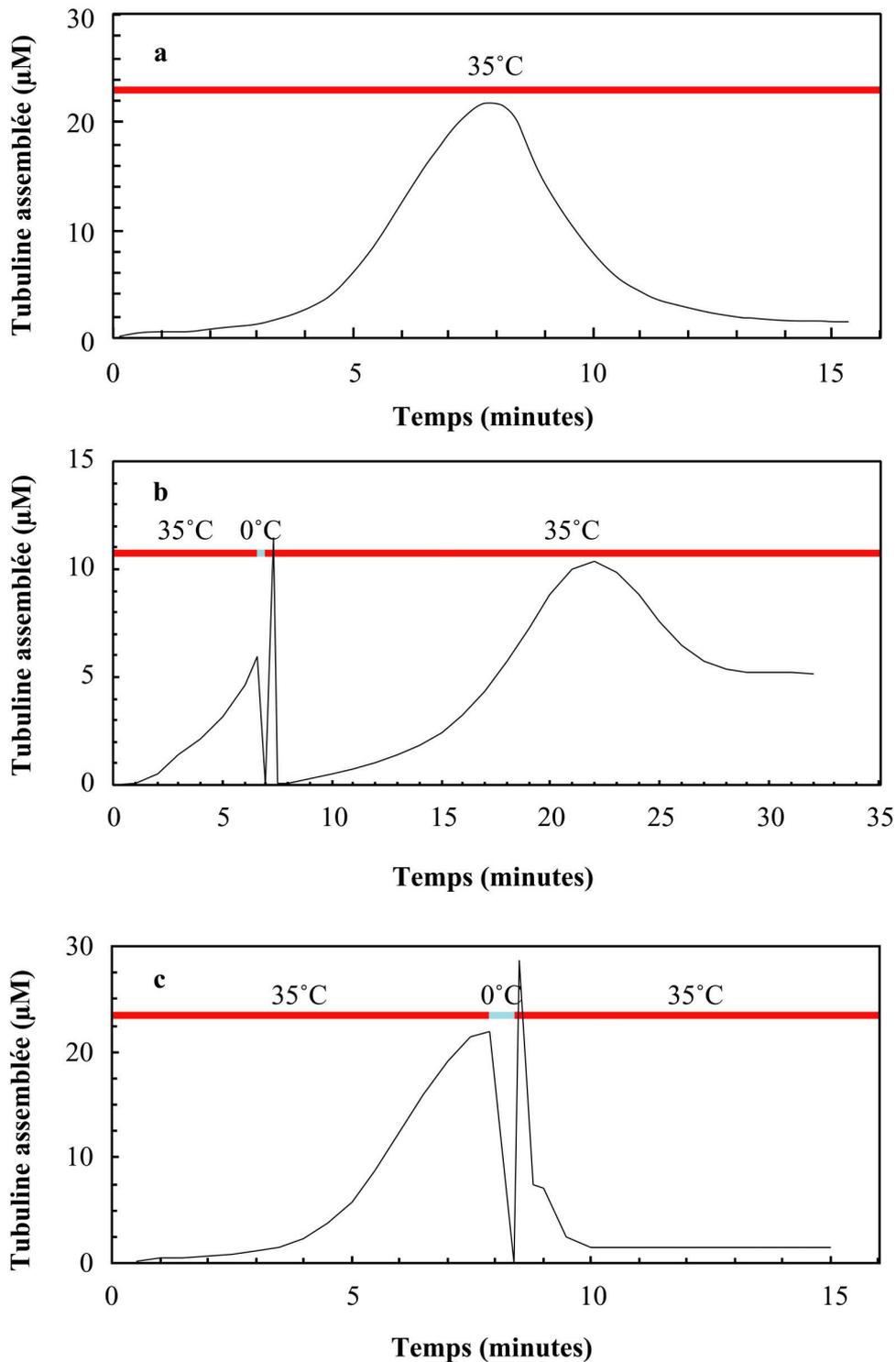


Figure III-2 : Maximum d'assemblage et concentration critique. (a) De la tubuline-GTP à 80 µM a été incubée à 35°C en l'absence de GTP libre. La quantité de tubuline assemblée a été mesurée par turbidimétrie (absorbance à 350 nm). (b) De la tubuline-GTP à 80 µM a été incubée à 35°C en l'absence de GTP libre. La solution a été refroidie rapidement par immersion dans un mélange glace-acétone (env. -20°C) pendant la phase d'assemblage, puis réchauffée à 35°C. (c) De la tubuline-GTP à 80 µM a été incubée à 35°C en l'absence de GTP libre. La solution a été refroidie rapidement dans un mélange glace-acétone au moment du maximum d'assemblage puis réchauffée à 35°C. La température au cours du temps est indiquée au-dessus de chaque graphe.

III.1.2 La nucléation

Dans les modèles classiques de cinétique d'assemblage des microtubules, le nombre de microtubules est supposé fixé très rapidement au début de la réaction. Cette hypothèse repose sur les modèles de condensation - nucléation (Oosawa et Kasai, 1962). Selon ce modèle, la formation de microtubules nécessite l'assemblage de petits noyaux servant d'amorces pour la formation de microtubules. Pour former ces noyaux, n dimères de tubuline sont nécessaires. Alors la vitesse de formation des noyaux est fonction de la concentration en tubuline à la puissance n . Selon les auteurs, n varie entre 7 et 15 (Carlier et Pantaloni, 1978; Flyvbjerg *et al.*, 1996a; Kuchnir-Fygenson *et al.*, 1994; Kuchnir-Fygenson *et al.*, 1995; Voter et Erickson, 1984). Avec un tel exposant, une baisse de la concentration en tubuline-GTP entraînerait une baisse énorme de la vitesse de formation des noyaux d'assemblage. Dans nos conditions, la concentration en tubuline-GTP chute très rapidement après le début de la réaction. Le modèle de condensation - nucléation impliquerait alors une vitesse quasi-nulle de formation des noyaux dès les premiers instants de la réaction. Le nombre de microtubules devrait alors être constant pendant tout le reste de la réaction.

Nous avons mesuré au cours du temps la concentration en nombre de microtubules pour les réactions d'assemblage de tubuline présentées dans la figure III-1. Nous observons ici que le nombre de microtubules augmente tout au long de la phase d'assemblage, quelle que soit la concentration initiale en tubuline-GTP (figure III-3), et alors que la concentration en tubuline-GTP diminue fortement (figure III-1e). L'augmentation du nombre de microtubules au cours du temps est linéaire, ce qui signifie que le taux de formation de nouveaux microtubules au cours du temps est constant. Le taux de formation de nouveaux microtubules à un instant donné est donc indépendant de la quantité de tubuline-GTP présente à cet instant dans la solution. En revanche, le taux de formation de nouveaux microtubules dépend fortement de la concentration initiale en tubuline-GTP. Nos résultats sont donc en contradiction avec le modèle de condensation - nucléation.

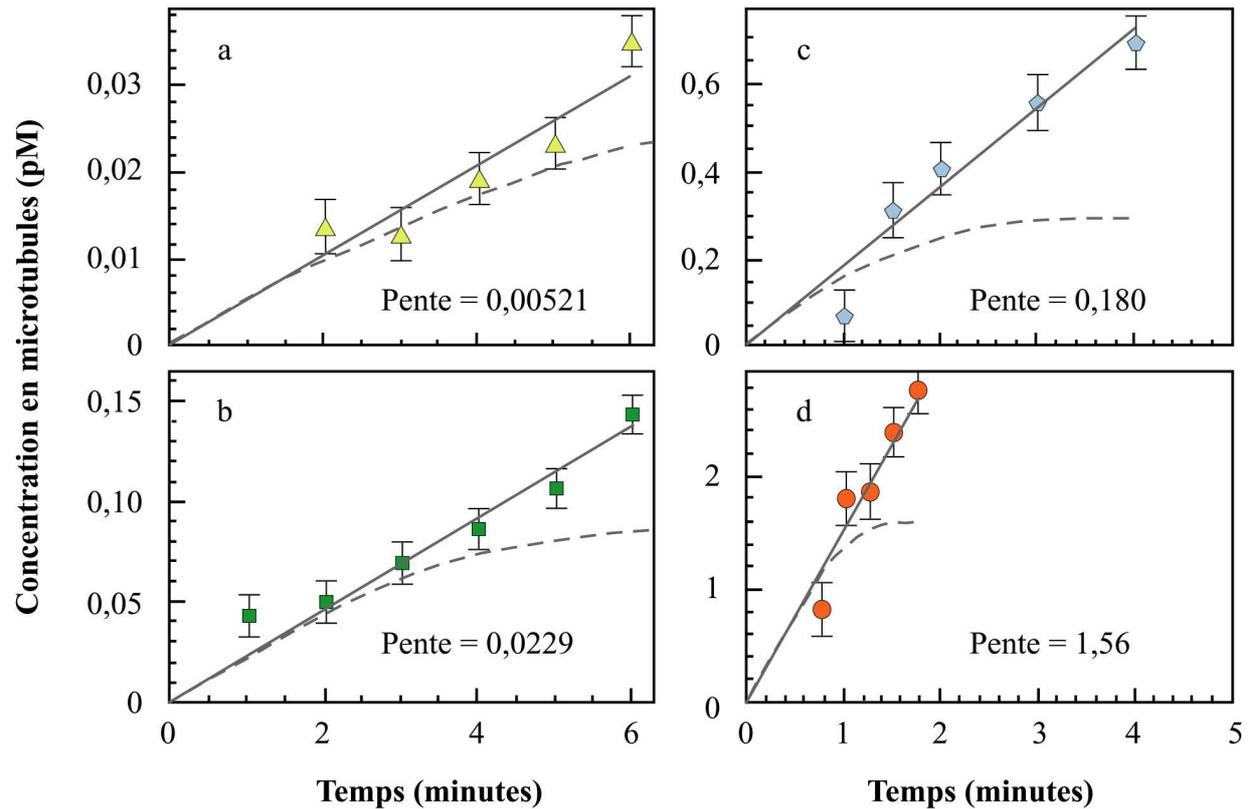


Figure III-3 : Concentration en nombre de microtubules au cours du temps. La concentration en nombre de microtubules a été déterminée aux temps indiqués et pour différentes concentrations initiales en tubuline-GTP : (a) 60 μM ; (b) 75 μM ; (c) 105 μM ; (d) 150 μM . Le temps 0 correspond au début de la réaction d'assemblage. Après 6 minutes d'assemblage, la longueur moyenne des microtubules dépasse 60 μm , empêchant la détermination de la concentration en nombre de microtubules pendant toute la réaction en a et b. En c et d, les mesures s'arrêtent au moment où l'assemblage atteint 80% de l'assemblage maximal, excluant la zone de transition entre les phases d'assemblage et de désassemblage. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance. Les droites de régression linéaire des données sont représentées en trait plein. Les courbes en pointillés représentent les concentrations en nombre de microtubules attendues si le taux de nucléation de nouveaux microtubules était proportionnel à chaque instant t à $[Tubuline-GTP(t)]^{6,2}$ (voir le texte).

Dans les modèles classiques de nucléation des microtubules, le taux de formation de nouveaux microtubules à un instant t , $V_n(t)$ s'écrit :

$$V_n(t) = K \cdot [Tubuline - GTP(t)]^\beta$$

Dans cette équation, $[Tubuline-GTP(t)]$ représente la concentration en tubuline-GTP à l'instant t , K une constante et β le nombre de dimères de tubuline-GTP nécessaires pour former une amorce de microtubules. Le graphe de $V_n(t)$ en fonction de $[Tubuline-GTP(t)]$ dans des coordonnées logarithmiques est alors linéaire, de pente β . Nous observons ici que le taux de formation de nouveaux microtubules dépend de la concentration initiale en tubuline-GTP. Par analogie avec les modèles de condensation – nucléation, les valeurs du taux de nucléation ont été reportées en fonction de la concentration initiale en tubuline-GTP dans un

graphe logarithmique (Figure III-4). Les quatre valeurs reportées s'alignent sur une droite, avec une pente $\beta = 6,2$.

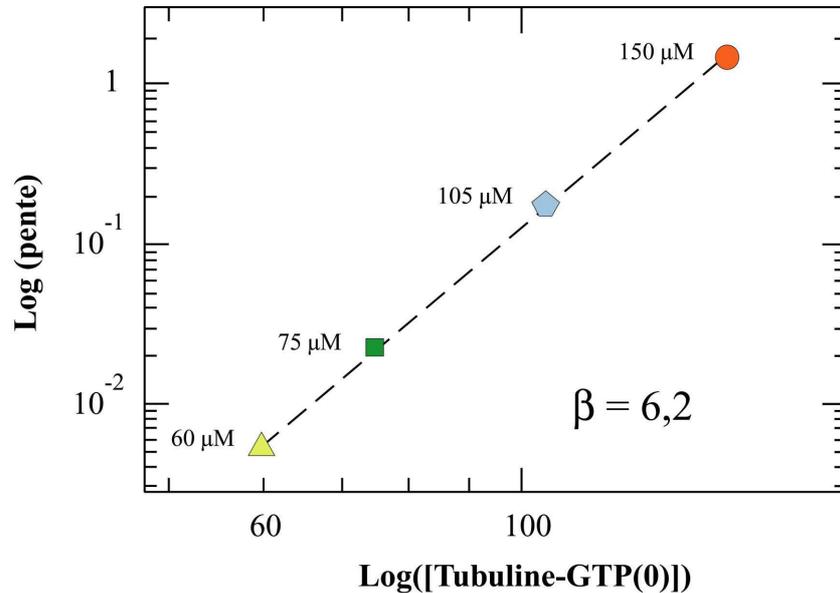


Figure III-4 : Exposant de nucléation. Les pentes des courbes de concentration en nombre de microtubules (figure III-3) ont été reportées en fonction de la concentration initiale en tubuline-GTP dans un graphe en coordonnées logarithmiques. La droite de régression linéaire de pente β est tracée en pointillés.

Nos données indiquent donc que le taux de formation de nouveaux microtubules dépend de la concentration en tubuline-GTP dans les tous premiers instants de la réaction. Puis cette dépendance vis à vis de la concentration en tubuline-GTP est rapidement perdue. Nous avons voulu vérifier que la vitesse de formation de nouveaux microtubules ne pouvait pas dépendre à tout instant de la concentration en tubuline-GTP présente dans la solution. Nous avons donc simulé l'évolution du taux de formation de nouveaux microtubules au cours du temps en supposant que celui-ci dépendait en permanence de la concentration en tubuline-GTP présente dans la solution.

Cette modélisation repose sur les résultats des figures III-3 et III-4, qui montrent que quelle que soit la concentration initiale en tubuline-GTP, de nouveaux microtubules sont créés à un taux constant, α_C :

$$\frac{dN(t)}{dt} = \alpha_C \quad (\text{équation 1}),$$

où $N(t)$ est le nombre de microtubules au temps t .

Quand les valeurs de α_C sont représentées en fonction de la concentration initiale en tubuline-GTP dans un graphe à coordonnées logarithmiques, une courbe linéaire est obtenue (Figure III-4). Donc :

$$\frac{dN(t)}{dt} = \alpha_C = K \cdot [\text{Tubuline} - \text{GTP}(0)]^\beta \quad (\text{équation 2}),$$

où $[Tubuline - GTP(0)]$ est la concentration initiale en tubuline-GTP et β la pente du graphe logarithmique (ici, $\beta \approx 6,2$).

L'équation 2 reflète que pendant la phase d'assemblage, les microtubules sont créés à un taux constant déterminé par la concentration initiale en tubuline-GTP. Les modèles actuels, fondés sur la loi d'action de masse prendraient en compte la concentration instantanée en tubuline-GTP plutôt que la concentration initiale. Pour tester si ces modèles peuvent être compatibles avec les données obtenues, les concentrations $N(T)$ à l'instant T , prédites par ce modèle ont été calculées par intégration numérique de l'équation suivante, en prenant en compte les concentrations en tubuline-GTP mesurées et la valeur de β obtenue ici :

$$N(T) = \int_0^T K \cdot [Tubuline - GTP(t)]^\beta \cdot dt \quad \text{Equation 3.}$$

Les résultats de ces modélisations sont présentés dans la figure III-3 (tirets).

La déviation entre les résultats expérimentaux et les simulations exclut que le taux de formation de nouveaux microtubules puisse dépendre de la concentration instantanée en tubuline-GTP. Tout d'abord, d'après les simulations, le nombre de microtubules dans la solution augmenterait au début de la réaction puis atteindrait rapidement un plateau. Ainsi pour une concentration initiale de 105 μM par exemple, le plateau serait atteint après environ 2 minutes, alors que les mesures montrent une augmentation linéaire du nombre de microtubules pendant au moins les quatre premières minutes. Ensuite, pour cette même concentration initiale de 105 μM de tubuline-GTP, après quatre minutes de réaction, le nombre de microtubules mesuré dans la solution est environ le triple de celui prédit par la simulation. De telles déviations entre les mesures et les simulations sont incompatibles avec l'hypothèse que la formation de nouveaux microtubules dépendrait en permanence de la concentration en tubuline-GTP libre.

III.1.3 L'élongation

Nous avons mesuré au cours du temps l'évolution de la longueur moyenne des microtubules pour les réactions d'assemblage présentées dans la figure III-1. Nous observons que la longueur moyenne des microtubules augmente linéairement au cours du temps (figure III-5a). De plus, l'augmentation est linéaire avec une même pente pour les quatre concentrations initiales en tubuline-GTP testées. La longueur moyenne des microtubules évolue donc indépendamment de la concentration en tubuline-GTP libre à chaque instant et de la concentration initiale en tubuline-GTP. La longueur moyenne des microtubules ne dépend donc que du temps écoulé depuis le début de la réaction.

Nous avons voulu savoir comment évolue la longueur de chaque microtubule au cours du temps, et ainsi obtenir des informations sur la vitesse d'élongation des microtubules individuels. Dans nos conditions, la concentration en tubuline-GTP chute fortement et rapidement après le début de la réaction (figure III-1e). On pourrait donc s'attendre à une baisse de la vitesse d'élongation des microtubules individuels. La longueur moyenne des

microtubules devrait alors augmenter de moins en moins au vite au cours de la réaction. Toutefois, dans le même temps, le nombre de microtubules augmente et pourrait contrebalancer la baisse de la concentration en tubuline-GTP.

Nous avons testé deux hypothèses simples pour la vitesse d'élongation des microtubules. Nous avons considéré d'une part l'hypothèse d'une vitesse d'élongation de chaque microtubule constante, indépendante de la concentration initiale et instantanée en tubuline-GTP. D'autre part, nous avons considéré l'hypothèse d'une vitesse d'élongation pour chaque microtubule proportionnelle à la concentration instantanée en tubuline-GTP et à la concentration en microtubules. Nous avons simulé l'évolution de la réaction sous chacune de ces deux hypothèses. Dans les deux cas, nous avons pris en compte la quantité de tubuline assemblée à chaque instant pour respecter la conservation de matière. Nous avons ainsi calculé les valeurs des longueurs moyennes des microtubules pendant la phase d'assemblage en prenant en compte le taux de formation de nouveaux microtubules et la concentration en tubuline-GTP mesurée pour les différentes concentrations initiales en tubuline-GTP (Figure III-1). Les graphes d'évolution de la concentration en tubuline-GDP en fonction du temps (figure III-8, voir plus loin) indiquent que le désassemblage des microtubules est négligeable pendant la phase de la réaction où la longueur moyenne des microtubules a été mesurée. Ainsi, les événements de désassemblage peuvent ne pas être pris en compte dans ces modèles.

En considérant que la vitesse d'élongation est proportionnelle à la concentration en tubuline-GTP libre, la longueur d'un microtubule créé à l'instant t et observé à l'instant T est :

$$l(t, T) = \int_t^T \varepsilon \cdot [\text{Tubuline} - \text{GTP}(t)] \cdot dt \quad (\text{équation 4})$$

où ε est la constante d'élongation en $\mu\text{m} \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{minute}^{-1}$ et $[\text{Tubuline} - \text{GTP}(t)]$ la concentration en tubuline-GTP à l'instant t . Pour une valeur donnée de ε , et pour tout couple de valeur (t, T) , la longueur $l(t, T)$ peut être déterminée par intégration numérique en utilisant les valeurs de $[\text{Tubuline} - \text{GTP}(t)]$ présentées dans la figure III-1e. Puis la valeur moyenne de la longueur des microtubules est calculée :

$$\bar{L}(t) = \frac{1}{T} \int_0^T l(t, T) \cdot dt \quad (\text{équation 5})$$

Cette simulation nécessite l'estimation de la constante d'élongation de la loi d'action de masse. Pour cela, différentes valeurs de cette constante ε ont été testées pour accorder autant que possible les valeurs calculées avec celles observées, soit pour la concentration de 60 μM (Figure III-5b tirets) soit pour celle de 150 μM (Figure III-5b pointillés). On constate que dans aucun de ces cas il n'y a concordance entre les valeurs calculées et celles observées. La vitesse d'élongation ne dépend donc pas directement de la concentration instantanée en tubuline-GTP. L'hypothèse alternative la plus simple serait que la vitesse d'élongation pour chaque microtubule soit constante et indépendante de la concentration initiale ou instantanée en tubuline-GTP.

En considérant que la vitesse d'élongation de chaque microtubule est constante, on impose :

$$\frac{dl}{dt} = C \quad (\text{équation 5})$$

Dans cette équation, l est la longueur d'un microtubule et C la constante d'élongation, en $\mu\text{m}\cdot\text{minute}^{-1}$. La longueur d'un microtubule créé à l'instant t et observé à l'instant T est alors :

$$l(t, T) = C \cdot (T - t) \quad (\text{équation 6})$$

Ainsi, la somme des longueurs de tous les microtubules à l'instant T est $L_{Tot}(T)$:

$$L_{Tot}(T) = \int_0^T \alpha_C \cdot l(t, T) \cdot dt \quad (\text{équation 7})$$

Et le nombre total de microtubules à l'instant T est $N(T)$, obtenu en intégrant l'équation 1 :

$$N(T) = \int_0^T \alpha_C \cdot dt \quad (\text{équation 8})$$

Enfin, la longueur moyenne des microtubules est obtenue en divisant la longueur totale de microtubules (équation 7) par le nombre de microtubules (équation 8), et ceci pour chaque instant T . L'équation obtenue se simplifie :

$$\bar{L}(T) = \frac{1}{T} \int_0^T l(t, T) \cdot dt \quad (\text{équation 9})$$

En prenant $l(t, T)$ d'après l'équation 6 et par intégration, on obtient :

$$\bar{L}(T) = \frac{1}{2} \cdot C \cdot T \quad (\text{équation 10})$$

Dans ce cas, le modèle est extrêmement simple et la longueur moyenne des microtubules augmente linéairement au cours du temps, indépendamment de la concentration instantanée en microtubules et aussi de la concentration initiale en tubuline-GTP. De plus, dans ce modèle, la vitesse d'augmentation de la longueur moyenne des microtubules est la moitié de la vitesse d'élongation d'un microtubule individuel. Nous observons une augmentation de la longueur moyenne des microtubules de $8,9 \mu\text{m}\cdot\text{minute}^{-1}$ (Figure III-5). La vitesse d'élongation d'un microtubule individuel serait donc de $17,8 \mu\text{m}\cdot\text{minute}^{-1}$.

En conclusion, un microtubule s'allonge à une vitesse constante, indépendante de la concentration en tubuline-GTP pendant presque toute la phase d'assemblage.

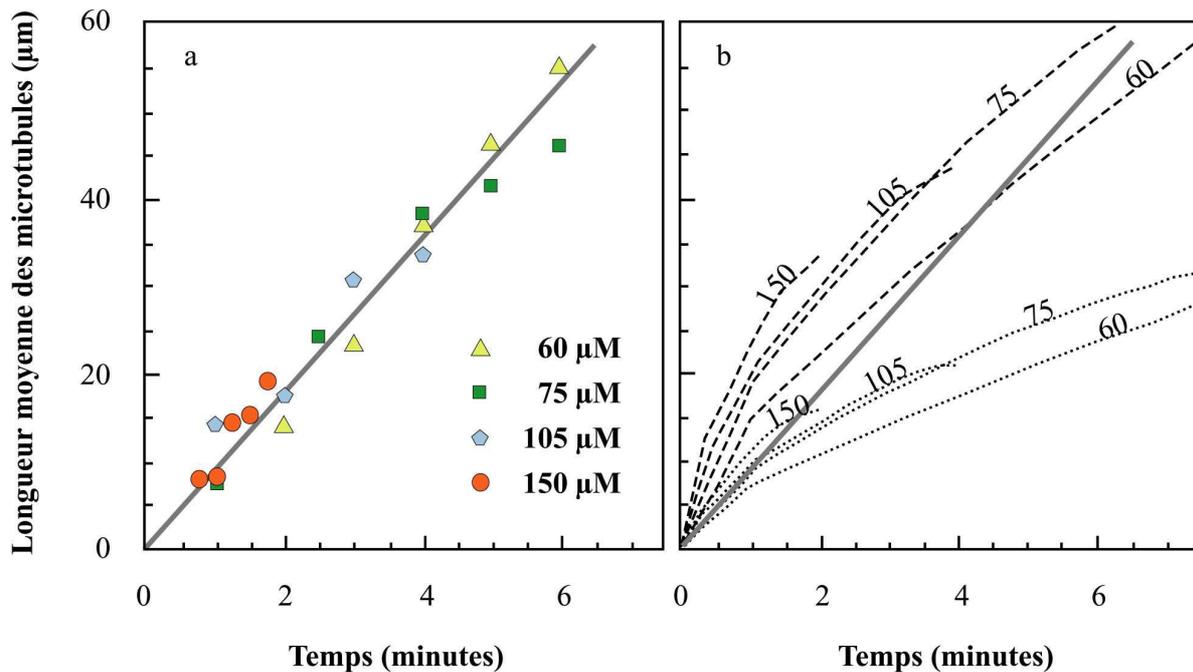


Figure III-5 : Longueur moyenne des microtubules au cours du temps. (a) La longueur moyenne des microtubules a été mesurée aux temps indiqués pour différentes concentrations initiales en tubuline-GTP. Le temps 0 correspond au début de la réaction. En trait plein est indiquée la droite de régression linéaire de toutes les données expérimentales. Sa pente est de $8,9 \mu\text{m}\cdot\text{minute}^{-1}$. (b) Prédiction de l'évolution de la longueur moyenne des microtubules sous deux hypothèses différentes. En tirets et en pointillés, la vitesse d'élongation de chaque microtubule est proportionnelle à $[\text{Tubuline-GTP}(t)]$ et à la concentration en nombre de microtubules. Dans ce cas, la vitesse d'élongation de chaque microtubule dépend d'une constante ε (équation 4, voir le texte) dont la valeur est inconnue. Différentes valeurs d' ε ont été testées pour approcher au mieux les données expérimentales, et les courbes attendues pour les quatre concentrations initiales en tubuline-GTP testées ont été calculées. Dans tous les cas, ces courbes dévient des données expérimentales. Les faisceaux de courbes en tirets et en pointillés correspondent aux courbes prédites pour les concentrations initiales en tubuline-GTP indiquées, en choisissant ε pour approcher au mieux les données à $60 \mu\text{M}$ (tirets) ou à $150 \mu\text{M}$ (pointillés) de tubuline-GTP initiale. En trait plein, la vitesse d'élongation des microtubules est indépendante de la concentration en tubuline-GTP libre et a été fixée à deux fois la vitesse d'augmentation de la longueur moyenne soit $2 \times 8,9 = 17,8 \mu\text{m}\cdot\text{minute}^{-1}$ (équations 5 et 10, voir le texte). Dans ce cas, la courbe attendue est identique à la droite de régression obtenue en (a).

III.1.4 Le désassemblage

La cinétique de désassemblage a été étudiée dans le cas des concentrations initiales en tubuline-GTP de $105 \mu\text{M}$ et $150 \mu\text{M}$. Pour ces deux concentrations initiales en tubuline-GTP, la longueur moyenne des microtubules a été mesurée pendant toute la durée de l'assemblage et du désassemblage. Nous avons tout d'abord voulu savoir si des microtubules continuaient à assembler pendant la phase de désassemblage global. Pour cela, nous avons examiné la

quantité de tubuline-GTP hydrolysée durant la phase de désassemblage, mais en excluant la phase de transition entre assemblage et désassemblage. Nous avons donc considéré la phase de désassemblage correspondant à un passage de 90% à 0% de la quantité maximale de tubuline assemblée : la quantité de tubuline-GTP hydrolysé durant cette phase est très faible (figure III-1e). La quantité de tubuline-GTP incorporée dans les microtubules pendant cette phase est donc extrêmement faible : elle représente moins de 2% de la quantité maximale de tubuline assemblée. Très peu de tubuline est donc assemblée en microtubules dans nos conditions expérimentales pendant la phase de désassemblage global.

La longueur moyenne et les distributions de longueur des microtubules au cours de la phase de désassemblage ont été reportées pour les réactions à 105 μM et à 150 μM (Figure III-6). On observe que la longueur moyenne des microtubules reste constante au cours du temps (figure III-6a). De plus, le mode de la distribution de longueur, la longueur maximale des microtubules et les proportions de microtubules dans chacune des classes de longueur restent constantes pendant la phase de désassemblage : l'allure générale des distributions de longueur ne change pas au cours du temps (figure III-6b-c).

A partir de ces résultats (figure III-6), nous avons examiné comment évoluait la longueur des microtubules. Pour expliquer que la longueur moyenne des microtubules reste constante alors que la quantité de tubuline assemblée diminue rapidement, on peut proposer deux hypothèses : soit une grande proportion des microtubules raccourcit, mais une proportion des microtubules continue de s'allonger et compense le raccourcissement des autres microtubules ; soit les microtubules désassemblent au hasard, indépendamment de leur longueur. Or la quantité de tubuline assemblée pendant la phase de désassemblage est négligeable : il semble donc que les microtubules commencent à désassembler indépendamment de leur longueur et qu'ils désassemblent complètement une fois qu'ils ont commencé à désassembler : l'assemblage aurait lieu par catastrophes. Ce résultat est confirmé par les distributions de longueur des microtubules, qui ne changent pas au cours du désassemblage. Le désassemblage est donc limité par le taux de catastrophe et non par la vitesse de raccourcissement des microtubules individuels. En effet, si le facteur limitant était la vitesse de désassemblage, on observerait une diminution de la longueur moyenne des microtubules au cours de la phase de désassemblage, ce qui n'est pas le cas. Ainsi, quelle que soit la longueur d'un microtubule, le temps de dépolymérisation complète de celui-ci est très court par rapport au temps à partir duquel il commence à désassembler.

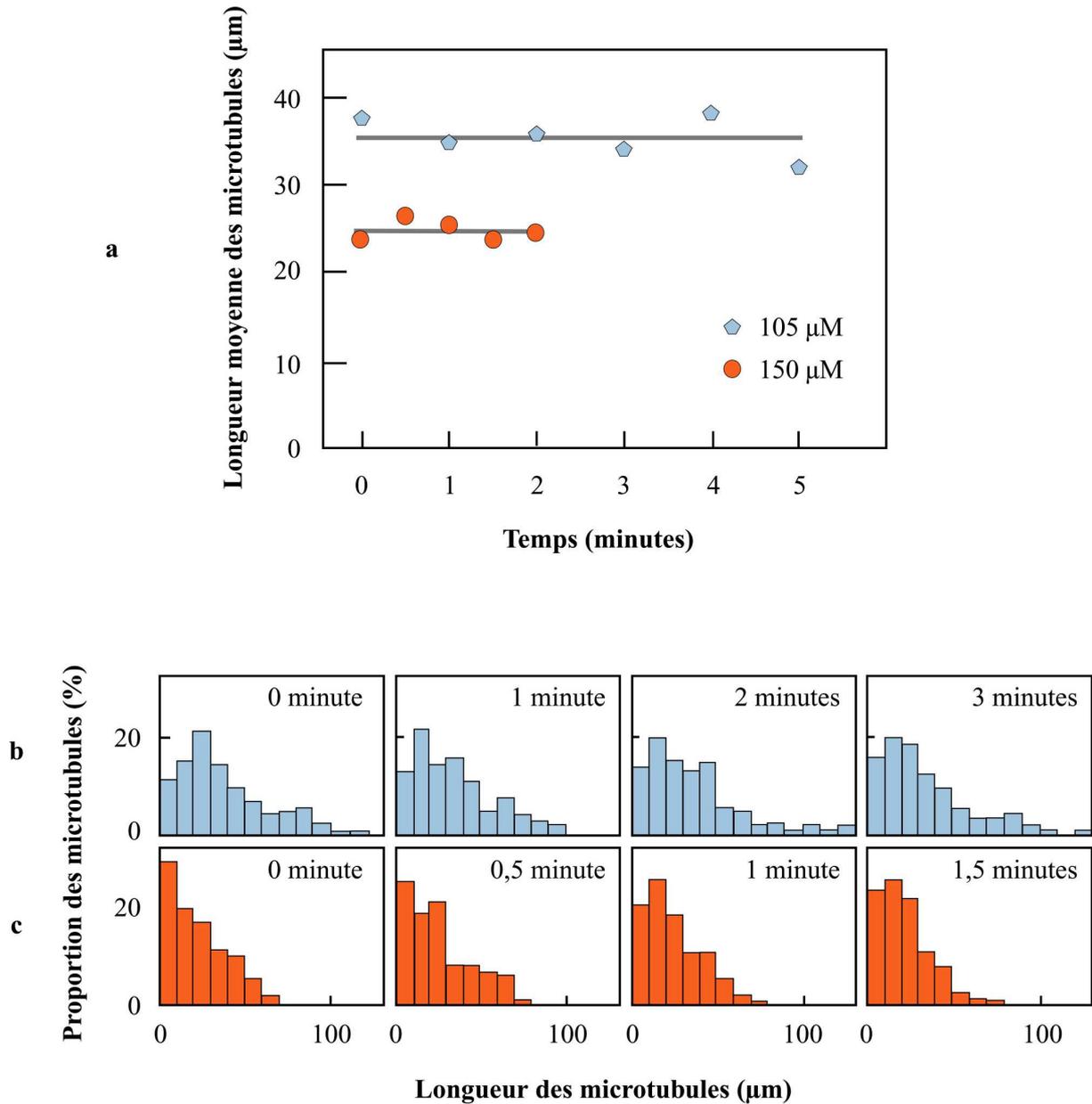


Figure III-6 : Analyse du désassemblage des microtubules. (a) longueur moyenne des microtubules au cours du temps pendant la phase de désassemblage, mesurée pour deux concentrations initiales en tubuline-GTP. Le temps 0 correspond au maximum de la courbe d'assemblage (figure III-1). En traits pleins, moyenne des longueurs moyennes des microtubules pendant le désassemblage. (b) et (c) distribution des longueurs des microtubules aux temps indiqués pour deux concentrations initiales en tubuline-GTP (b : 105 μM ; c : 150 μM). En abscisses, classes de longueurs des microtubules en μm (largeur des classes : 10 μm), en ordonnée pourcentage de microtubules dans chaque classe de longueurs. Le temps 0 correspond au maximum de la courbe d'assemblage.

Nous avons examiné l'influence de la concentration en tubuline-GTP sur le désassemblage des microtubules. Le désassemblage ayant lieu par catastrophes, le temps nécessaire pour désassembler la moitié de la quantité maximale de tubuline assemblée est une mesure du temps de demi-vie d'un microtubule. La demi-vie d'un microtubule est l'inverse

du taux de catastrophe. Nous avons examiné la variation de cette demi-vie en fonction de la concentration initiale en tubuline-GTP (Figure III-7), d'après les courbes de la figure III-1. La demi-vie d'un microtubule varie très fortement avec la concentration initiale en tubuline-GTP, puisqu'elle est vingt fois plus courte pour une concentration initiale en tubuline-GTP de 150 μM par rapport à 60 μM . Cet effet ne peut pas être expliqué par des variations dans la concentration en tubuline-GTP libre pendant la phase de désassemblage. En effet, quelle que soit la concentration initiale en tubuline-GTP, la concentration en tubuline GTP est de 30 μM au début du désassemblage et de 15 μM en fin de désassemblage (figure III-1). Une autre hypothèse serait d'impliquer la tubuline-GDP, produit du désassemblage des microtubules.

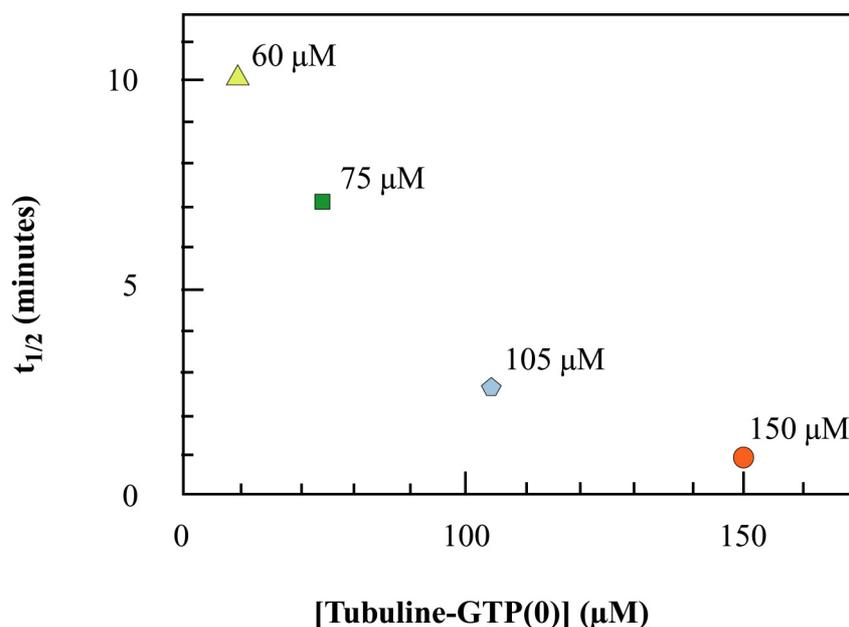


Figure III-7 : Temps de demi-désassemblage. Le temps nécessaire pour désassembler la moitié de la quantité de tubuline incorporée dans des microtubules ($t_{1/2}$) a été reporté en fonction de la concentration initiale en tubuline-GTP. Sous l'hypothèse que les microtubules désassemblent au hasard par catastrophe, $t_{1/2}$ représente le temps de demi-vie moyenne des microtubules pendant la phase de désassemblage.

A partir des résultats de la figure III-1, nous avons calculé la concentration de tubuline-GDP libre présente au cours de la réaction :

$$[\text{Tubuline-GDP libre}](t) = [\text{Tubuline-GTP}](0) - [\text{Tubuline-GTP}](t) - [\text{Tubuline assemblée}](t)$$

La quantité de tubuline-GDP libre présente dans la solution pendant le désassemblage est d'autant plus importante que la concentration initiale en tubuline-GTP est élevée (Figure III-8). Si la tubuline-GDP influençait la vitesse de désassemblage des microtubules, l'ajout de tubuline-GDP au milieu réactionnel devrait donc accélérer le désassemblage. Cette hypothèse a été examinée plus en détail.

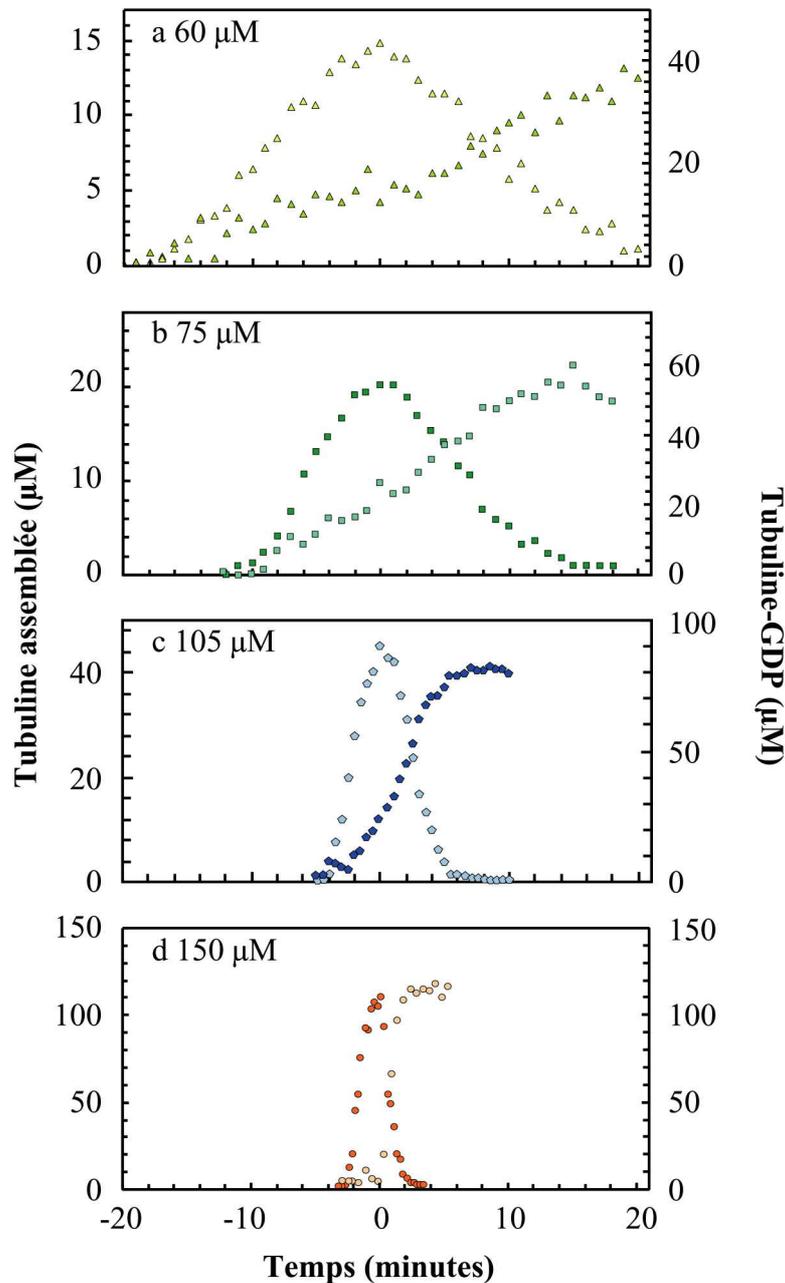


Figure III-8 : Concentration en tubuline-GDP libre au cours de la réaction d'assemblage aux quatre concentrations testées. La concentration en tubuline-GDP libre a été calculée d'après les données de la figure III-1 pour différentes concentrations initiales en tubuline-GTP. $[Tubuline-GDP \text{ libre}](t) = [Tubuline-GTP](0) - [Tubuline-GTP](t) - [Tubuline \text{ assemblée}](t)$ Le temps 0 correspond au maximum de la réaction d'assemblage. La quantité de tubuline assemblée (figure III-1) est représentée et est indiquée sur l'axe des ordonnées à gauche. La quantité de tubuline-GDP libre est indiquée sur l'axe des ordonnées à droite.

III.1.5 Effet de l'ajout de tubuline-GDP

Il a été montré que la tubuline-GDP pouvait ralentir l'élongation des microtubules (Bayley et Martin, 1986) ou augmenter la fréquence des catastrophes (Caplow et Shanks, 1995). Toutefois, ces résultats sont controversés et d'autres auteurs ont au contraire montré que la tubuline-GDP diminuait l'instabilité dynamique en abaissant les fréquences de catastrophes (Vandecandelaere *et al.*, 1995). De plus, une faible proportion de tubuline-GDP peut être incorporée dans les microtubules (Hamel *et al.*, 1986; Zeeberg et Caplow, 1981). Nous avons examiné cette question en réalisant des réactions d'assemblage de tubuline-GTP en présence de quantités variables de tubuline-GDP, en l'absence de nucléotides libres. En utilisant soit de la tubuline-GTP marquée radioactivement, soit de la tubuline-GDP marquée radioactivement, nous avons pu évaluer l'incorporation de tubuline-GDP dans les microtubules. En parallèle, nous avons mesuré la concentration en tubuline-GTP et la longueur moyenne des microtubules.

On observe que plus on ajoute de tubuline-GDP à une solution de tubuline-GTP de concentration donnée, plus la réaction d'assemblage et désassemblage est lente (figure III-9a-e). La phase de désassemblage est beaucoup plus ralentie que la phase d'assemblage. Corrélativement, la concentration en tubuline-GTP diminue également plus lentement au cours du temps (figure III-9a-b).

Ensuite, la quantité de tubuline-GDP incorporée a été mesurée. Pour cela, la tubuline-GDP a été marquée radioactivement en réalisant un assemblage en présence de $8\text{-}^3\text{H-GTP}$, centrifugation des microtubules sur un coussin de PEM/Glycérol 60% v : v, et désassemblage des microtubules en tubuline-GDP. La tubuline-GDP est alors filtrée sur Biogel P30 pour éliminer les nucléotides libres. Cette tubuline-GDP marquée est ensuite chauffée à 37°C en présence de tubuline-GTP non marquée et les microtubules formés sont pontés covalamment par de la glutaraldéhyde et transférés sur filtres en fibres de verre Whatman GF/F comme décrit précédemment. La quantité de radioactivité en tritium est proportionnelle à la quantité de tubuline-GDP incorporée dans les microtubules (Figure III-10). Toutefois, les solutions de tubuline purifiées contiennent une activité nucléoside-diphosphate-kinase qui catalyse la formation de GMP et GTP à partir de deux molécules de GDP (Nickerson et Wells, 1978). Cette activité enzymatique pourrait fausser les mesures puisque le GDP marqué pourrait être converti en GTP avant assemblage. Cette hypothèse est cependant peu probable puisqu'il n'y a que très peu de nucléotides libres. Pour s'en assurer, nous avons tenté de détecter cette activité en dosant le GMP qui devrait se former dans le milieu réactionnel. Les nucléotides ont été extraits puis séparés par HPLC. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de GMP détectable dans ces conditions (résultat non présenté). La radioactivité mesurée par le dosage sur filtres est donc bien une mesure de la quantité de tubuline-GDP incorporée dans les microtubules. Les résultats de la figure III-10 montrent que lorsqu'on ajoute 38 μM de tubuline-GDP à une solution de 105 μM de tubuline-GTP (soit 26,6% et 73,4% de la tubuline

totale respectivement), on a au maximum 7,5 μM de tubuline-GDP incorporée dans les microtubules et 41 μM de tubuline-GTP incorporée dans les microtubules. Les microtubules formés sont donc constitués à partir de tubuline-GDP (15,5%) et à partir de tubuline-GTP (84,5%). L'incorporation de tubuline-GDP est donc seulement deux fois moins facile que celle de la tubuline-GTP.

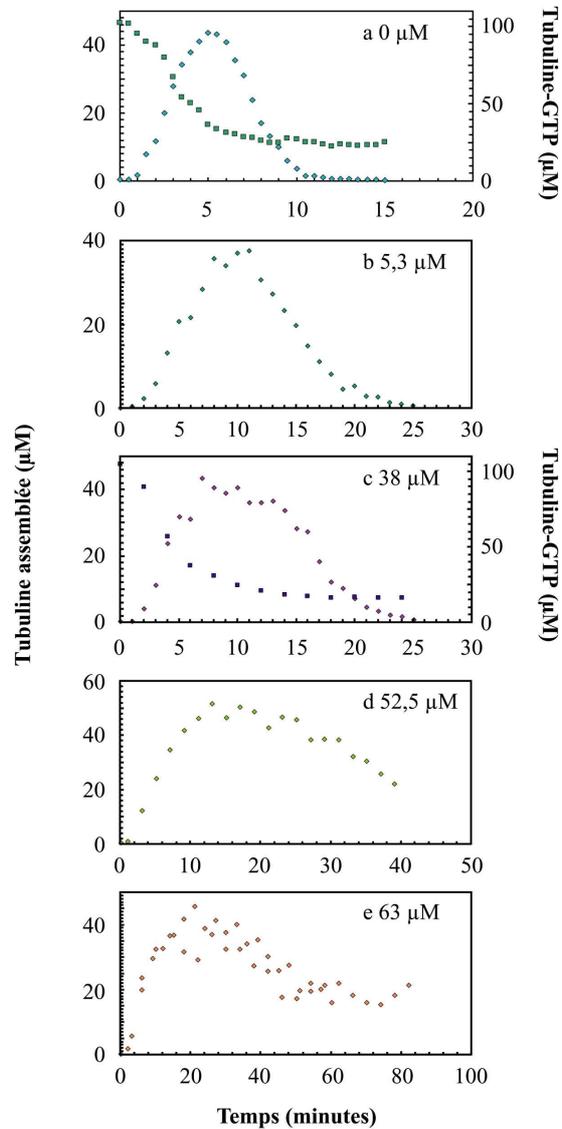


Figure III-9 : Effet de l'ajout de quantités croissantes de tubuline-GDP sur l'assemblage de tubuline-GTP en l'absence de GTP et de GDP libres. De la tubuline-GTP à la concentration de 105 μM a été assemblée en microtubules par chauffage à 35°C, en présence de différentes concentrations de tubuline-GDP : (a) 0 μM , (b) 5,3 μM , (c) 38 μM , (d) 52,5 μM et (e) 63 μM . Le temps 0 correspond au début de la réaction d'assemblage. Les losanges représentent la quantité de tubuline assemblée en microtubules à partir de tubuline-GTP, indiquée sur les axes des ordonnées à gauche. Les carrés (a et c) représentent la concentration en tubuline-GTP, indiquée sur l'axe des ordonnées à droite.

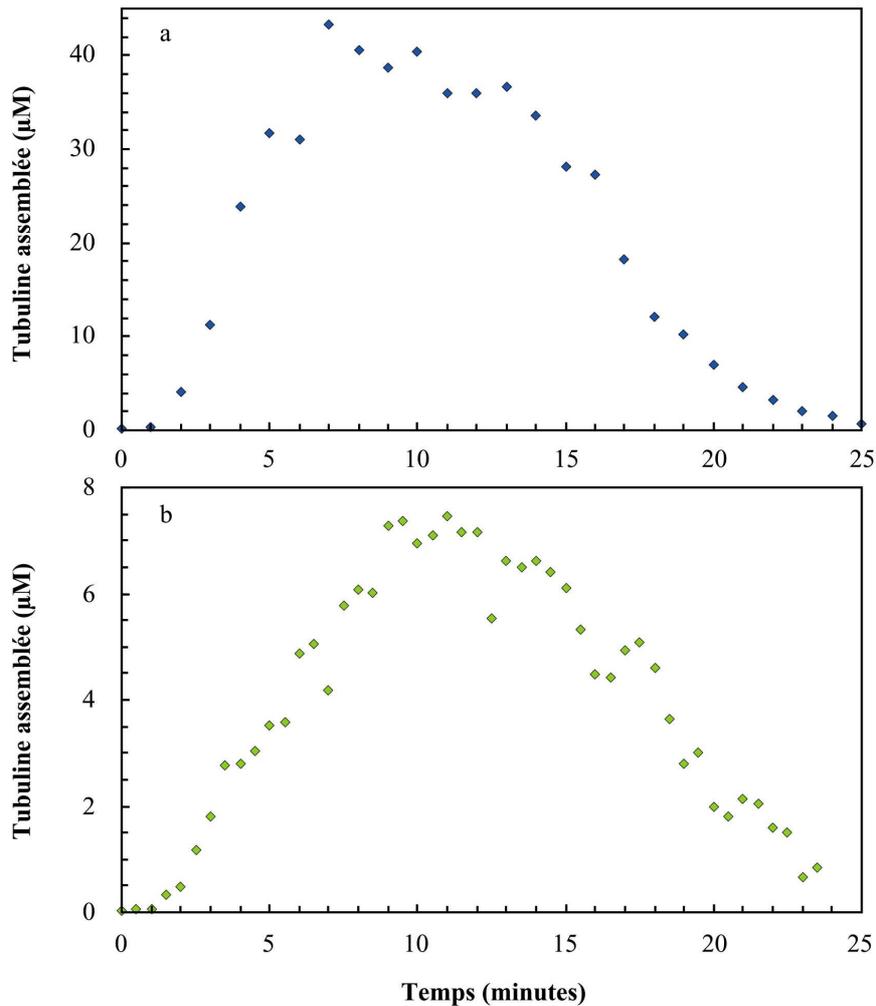


Figure III-10 : Incorporation de tubuline-GDP dans les microtubules. De la tubuline-GTP à la concentration de 105 µM a été assemblée en microtubules par chauffage à 35°C en présence de tubuline-GDP à la concentration de 38 µM, en l'absence de GTP et de GDP libres. (a) Concentration de tubuline assemblée en microtubules à partir de tubuline-GTP. Les mesures ont été effectuées par dosages sur filtres en utilisant de la tubuline marquée par du GTP tritié. (b) Concentration de tubuline assemblée en microtubules à partir de tubuline-GDP. La quantité de tubuline assemblée en microtubules à partir de tubuline-GDP a été mesurée en utilisant de la tubuline-GDP marquée au GDP tritié.

Par ailleurs, la longueur moyenne des microtubules évolue au cours du temps exactement de la même façon en présence ou en absence de tubuline-GDP (résultat non présenté). En effet, la longueur moyenne augmente linéairement au cours du temps, à une vitesse de 8,9 µm.minute⁻¹. La tubuline-GDP ne semble donc pas avoir d'effet sur la vitesse d'élongation des microtubules. Le taux de nucléation calculé est de 0,088 pM.minute⁻¹, alors qu'il est de 0,180 pM.minute⁻¹ en absence de tubuline-GDP. La tubuline-GDP inhibe donc la nucléation des microtubules.

Enfin, comme noté plus haut, la tubuline-GDP ajoutée au mélange réactionnel ne favorise pas le désassemblage des microtubules mais au contraire le ralentit, probablement en augmentant la demi-vie des microtubules. Au total, l'ajout de tubuline-GDP au milieu réactionnel augmente la persistance des microtubules, puisque la surface sous la courbe d'assemblage est fortement augmentée. Par ailleurs, la tubuline-GDP inhibe la nucléation et le désassemblage.

Comme noté plus haut, la symétrie des courbes d'assemblage / désassemblage en absence de tubuline-GDP (figure III-1) laisse penser que la nucléation de nouveaux microtubules et le temps de demi-vie des microtubules lors de la phase d'assemblage sont reliés. La recherche d'effecteurs rendant les courbes dissymétriques permettrait peut-être de comprendre cette relation entre nucléation et désassemblage. La tubuline-GDP est intéressante à cet égard, puisque l'ajout de grandes quantités de tubuline-GDP (> 35% de la tubuline-GTP) ralentit plus fortement le désassemblage que l'assemblage (figure III-9). Des études antérieures ont d'ailleurs montré qu'au-delà de 50% de tubuline-GDP, l'instabilité dynamique des microtubules était fortement diminuée (Vandecandelaere *et al.*, 1995).

III.1.6 Effet du magnésium

De nombreux auteurs (*e. g.* O'Brien et Erickson, 1989) ont montré que le magnésium stimule l'assemblage de la tubuline en microtubules. Nous avons cherché à déterminer sur quel(s) paramètre(s) il joue. Nous avons mesuré l'assemblage de tubuline-GTP en microtubules en l'absence de GTP libre comme précédemment à 60 μM et 75 μM , en présence de 1, 2 ou 5 mM de MgCl_2 . Nous avons déterminé la quantité de tubuline assemblée, la concentration en tubuline-GTP et la longueur moyenne des microtubules au cours du temps. Les courbes d'assemblage et de concentration en tubuline-GTP sont présentées dans la figure III-11.

La réaction d'assemblage / désassemblage est fortement accélérée, et ce d'autant plus que l'on ajoute du magnésium. La quantité maximale de tubuline assemblée en revanche, reste la même. Le magnésium accélère donc la cinétique de la réaction.

Pour ce qui concerne les mesures de longueurs (réalisées par Odile Valiron, résultats non présentés), les points s'alignent sur la droite de régression de la figure III-5. La longueur moyenne des microtubules augmente donc à la vitesse de 8,9 $\mu\text{m}\cdot\text{minute}^{-1}$, quelle que soit la concentration en magnésium. La vitesse d'élongation de chaque microtubule est donc de 17,8 $\mu\text{m}\cdot\text{minute}^{-1}$. Cette vitesse d'élongation semble donc être une constante de la dynamique des microtubules, puisque ni le magnésium ni la tubuline-GDP ne modifient cette valeur. Ainsi, pour des concentrations initiales en tubuline-GTP loin au-dessus de la concentration critique, la vitesse d'élongation des microtubules individuels est une propriété intrinsèque des microtubules, qui n'est pas influencée par la composition de la solution environnante.

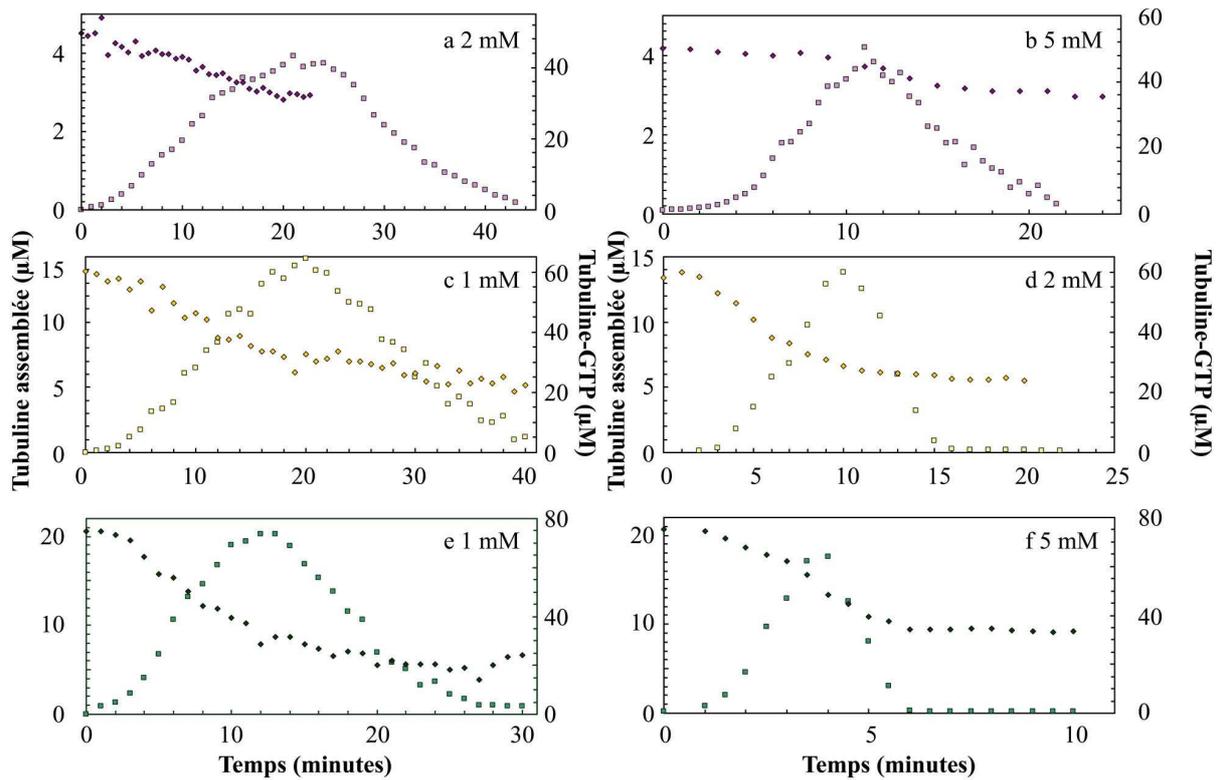


Figure III-11 : Assemblage de tubuline-GTP en présence de différentes concentrations de magnésium. De la tubuline-GTP à différentes concentrations (a-b : 50 μM ; c-d : 60 μM ; e-f : 75 μM) a été incubée à 35°C dans du PEM en présence de différentes concentrations de magnésium. La quantité de tubuline assemblée en microtubules a été mesurée (carrés, axe des ordonnées à gauche), ainsi que la concentration en tubuline-GTP (losanges, axe des ordonnées à droite). La concentration en magnésium est indiquée sur chaque graphique.

Par ailleurs, le magnésium a un effet sur la nucléation. En effet, lorsque la concentration en magnésium augmente, l'évolution des longueurs moyennes des microtubules reste inchangée, alors que l'assemblage de tubuline en microtubule est accéléré. Or la concentration en nombre de microtubules est proportionnelle au rapport de la tubuline assemblée sur la longueur moyenne des microtubules. La concentration en microtubules augmente donc également plus vite au cours du temps quand on rajoute du magnésium. Le magnésium stimule donc la nucléation de nouveaux microtubules. Toutefois, contrairement à ce qui se passe avec la tubuline-GDP, les courbes d'assemblage / désassemblage restent symétriques. Le magnésium a donc un effet comparable sur la nucléation des microtubules et sur la demi-vie des microtubules. Au total, le magnésium augmente globalement la vitesse de la réaction. La réaction reste limitée par la vitesse d'élongation des microtubules, et c'est sur la nucléation et le désassemblage des microtubules que porte l'effet du magnésium. Le magnésium, contrairement à la tubuline-GDP diminue le temps de persistance des microtubules, puisque la surface sous la courbe d'assemblage / désassemblage est fortement diminuée quand la concentration en magnésium est augmentée.

III.2 Discussion

Nos résultats montrent que dans nos conditions expérimentales, le taux de nucléation des microtubules dépend fortement de la concentration initiale en tubuline-GTP. Ce taux de nucléation restant constant pendant toute la phase d'assemblage, il est indépendant de la concentration en tubuline-GTP libre, malgré de fortes variations au cours de la réaction. La vitesse d'élongation des microtubules est également indépendante de la concentration en tubuline-GTP libre. De plus, la vitesse d'élongation des microtubules est indépendante de la concentration initiale en tubuline-GTP. La réaction d'assemblage de la tubuline en microtubules ne semble donc pas être limitée par la disponibilité en tubuline-GTP. Ces résultats semblent incompatibles avec les modèles classiques de l'assemblage des microtubules (Johnson et Borisy, 1977; Oosawa et Higashi, 1967; Oosawa et Kasai, 1962).

Par rapport aux travaux antérieurs, nous bénéficions des mesures systématiques des longueurs des microtubules (histogrammes des longueurs et longueur moyenne). Ces mesures présentent quelques difficultés, puisqu'il n'est pas impossible que des microtubules particulièrement longs soient cassés pendant les manipulations. Toutefois, les résultats les plus significatifs sont obtenus pour les réactions à forte concentration initiale en tubuline-GTP. Or dans ces conditions, les longueurs moyennes des microtubules sont faibles et donc moins sujettes à caution. D'ailleurs, les longueurs moyennes des microtubules s'alignent sur une droite de pente $8,9 \mu\text{m} \cdot \text{minute}^{-1}$, indépendamment des conditions initiales. Il est difficile d'imaginer comment une sous-estimation des longueurs des microtubules pour les grands microtubules pourrait donner un tel résultat. Ainsi, les difficultés techniques induisent un biais qui tendrait à minimiser les déviations entre nos observations et les modèles standards de l'assemblage des microtubules.

Pour expliquer que le taux de nucléation des microtubules est dépendant de la concentration initiale en tubuline-GTP et reste constant au cours de la réaction, il faut imposer deux contraintes au système. D'une part, les nouveaux microtubules se forment à partir de précurseurs qui sont présents dès le début de la réaction et dont la quantité est déterminée par la concentration initiale en tubuline-GTP. D'autre part, la tubuline-GTP utilisée pour la nucléation des microtubules et celle utilisée pour l'élongation des microtubules font partie de deux pools distincts. L'explication la plus simple de cette ségrégation en deux pools de la tubuline serait que très rapidement au début de la réaction d'assemblage, des oligomères de tubuline se forment de façon irréversible, à une concentration proportionnelle à la concentration en tubuline-GTP initiale. Si la formation de ces oligomères de nucléation est fortement dépendante de la concentration en tubuline-GTP, alors ils ne se forment qu'au début de la réaction d'assemblage. Si de plus la quantité d'oligomères formée excède suffisamment la quantité nécessaire à la nucléation de tous les microtubules, le taux de nucléation reste constant pendant toute la réaction d'assemblage. Enfin, si la formation des

oligomères de nucléation s'accompagne d'une hydrolyse du GTP en GDP, cette étape est irréversible.

D'autres auteurs ont impliqué la formation d'oligomères de tubuline dans les étapes de nucléation (Carlier *et al.*, 1997; Palmer *et al.*, 1982; Spann *et al.*, 1987). D'ailleurs, des oligomères de tubuline ont été observés dans les solutions microtubulaires (Mandelkow *et al.*, 1991; Spann *et al.*, 1987). Toutefois, ces modèles supposent que les oligomères sont en équilibre rapide avec les dimères de tubuline. De ce fait, la nucléation est dépendante de la concentration en tubuline-GTP tout au long de la réaction, et non de la concentration initiale en tubuline-GTP.

Nos résultats suggèrent que la nucléation de nouveaux microtubules semble se produire à partir d'oligomères de tubuline et non de dimères de tubuline. Dans nos conditions, avec un exposant de nucléation de 6,2, environ six oligomères semblent nécessaires pour former un nouveau microtubule. Toutefois, la valeur de cet exposant de nucléation pourrait varier selon les conditions expérimentales. D'autres auteurs ont d'ailleurs obtenu des exposants compris entre 8 et 15 Carlier et Pantaloni, 1978; Flyvbjerg *et al.*, 1996b; Kuchnir-Fygenson *et al.*, 1994; Kuchnir-Fygenson *et al.*, 1995; Voter et Erickson, 1984).

Dans nos conditions expérimentales, la vitesse d'élongation des microtubules semble déterminée par des propriétés intrinsèques des microtubules, indépendamment de la concentration en tubuline-GTP dans la solution. De plus, la vitesse d'élongation est indépendante aussi des conditions de la réaction : la présence de tubuline-GDP en quantités importantes ou encore de magnésium ne la modifie pas. La diffusion des dimères de tubuline vers l'extrémité d'un microtubule ne limite donc pas la vitesse d'élongation des microtubules dans nos conditions. Ce résultat est en accord avec d'autres travaux qui montraient que la vitesse d'élongation des microtubules est limitée, non par la diffusion, mais par la probabilité que les dimères s'additionnent à l'extrémité des microtubules (Kuchnir-Fygenson *et al.*, 1994). Des données structurales corroborent également ce résultat. Des observations en microscopie électronique suggèrent en effet que l'élongation des microtubules s'effectue en deux étapes. Dans un premier temps, les dimères s'additionneraient aux extrémités de microtubules en formant un feuillet bidimensionnel. Puis, ce feuillet se refermerait progressivement en tubule. Ces feuillets sont présents tout au long de la phase d'élongation, tant que la concentration en tubuline-GTP est au-dessus de la concentration critique. Ainsi, au-dessus de la concentration critique, la vitesse d'élongation des microtubules serait limitée par la vitesse de fermeture des feuillets. Au contraire, pour des concentrations proches de la valeur critique, la vitesse de fermeture des feuillets deviendrait plus grande que la vitesse d'élongation des feuillets, qui contrôlerait donc la vitesse d'élongation des microtubules (Chrétien *et al.*, 1995).

La vitesse d'élongation semble bien limitée par la structure même du microtubule, puisqu'elle est inchangée par l'ajout de magnésium qui accélère la réaction

d'assemblage / désassemblage ou l'ajout de tubuline-GDP qui la ralentit. La vitesse d'élongation mesurée ici est donc sans doute la vitesse maximale d'élongation des microtubules. Elle est d'ailleurs plus élevée que les vitesses mesurées lors d'observations en microscopie optique en temps réel. Pour des raisons techniques, ces mesures étaient d'ailleurs toutes effectuées autour de la concentration critique.

Pendant tout le désassemblage, il est important de noter que la longueur moyenne des microtubules et la distribution des longueurs des microtubules restent inchangées. Les microtubules ne désassemblent donc pas de façon synchrone en se raccourcissant tous peu à peu. Au contraire, un microtubule désassemble au hasard et indépendamment de sa longueur. De plus, un microtubule qui a commencé à désassembler disparaît rapidement. Ce résultat est compatible avec les études qui ont montré que les microtubules sont soumis à des catastrophes, c'est à dire qu'ils entrent aléatoirement en phase de désassemblage et dans l'immense majorité des cas désassemblent alors complètement (Horio et Hotani, 1986; Mitchison et Kirschner, 1984). Toutefois, ces catastrophes sont peu fréquentes. Ainsi, le désassemblage serait limité non par la vitesse de raccourcissement des microtubules qui semble très grande, mais par la fréquence de catastrophe. Les événements d'assemblage étant rares pendant la phase de désassemblage, et tous les microtubules ne désassemblant pas simultanément, de nombreux microtubules se trouvent donc dans un état métastable où ils ne s'allongent pas et ne se raccourcissent pas non plus. Un état métastable a également été décrit pour des microtubules à l'état stationnaire manifestant l'instabilité dynamique (Tran *et al.*, 1997).

De manière surprenante, nous observons que cette fréquence de catastrophes est fortement influencée par la concentration initiale en tubuline-GTP. Comment expliquer cette dépendance très forte, puisque les courbes d'assemblage / désassemblage sont très symétriques à toutes les concentrations en tubuline-GTP testées ? Une hypothèse serait que, la vitesse d'assemblage augmentant, les microtubules formés seraient moins stables, par exemple à cause de l'accumulation de défauts dans la structure des microtubules. Il a d'ailleurs été montré que la fréquence des catastrophes dépendait de la vitesse d'élongation des microtubules (Chrétien *et al.*, 1992). Toutefois, cette hypothèse ne peut être retenue puisque dans nos conditions, la vitesse d'élongation des microtubules est indépendante de la concentration initiale en tubuline-GTP. Il faut donc supposer qu'il se forme des facteurs de catastrophes dans la solution microtubulaire, en quantités croissantes avec la concentration initiale en tubuline-GTP. Il se pourrait que la tubuline-GDP produite par le désassemblage joue le rôle de facteur de catastrophe. La tubuline-GDP est en effet produite en quantités croissantes avec la concentration initiale en tubuline-GTP lors du désassemblage. Toutefois, l'ajout de tubuline-GDP au milieu réactionnel produite par désassemblage de microtubules ralentit la réaction d'assemblage / désassemblage. La tubuline-GDP ne semble donc pas être un facteur de catastrophe. On peut également proposer que ces facteurs de catastrophes soient

des protéines contaminantes. Dans ce cas, la cinétique de la réaction devrait varier avec la pureté de la tubuline utilisée. La PC-tubuline utilisée est de pureté variable comme observé en électrophorèse des protéines en conditions dénaturantes. Malgré cela, nous n'avons pas observé de variations dans nos mesures et les différents dosages sont très reproductibles. D'ailleurs, de la tubuline purifiée à homogénéité sur colonne d'affinité ne présente pas de propriétés cinétiques différentes de la PC-tubuline (Paturle *et al.*, 1989).

Les facteurs de catastrophes comme les facteurs de nucléation pourraient donc être des oligomères de tubuline. Ces oligomères se formeraient dans la solution en concentration proportionnelle à la concentration initiale en tubuline-GTP.

Il a déjà été montré qu'une grande diversité d'oligomères de tubuline pouvaient se former spontanément dans les solutions de tubuline, et les auteurs ont proposé qu'ils puissent jouer un rôle important dans le contrôle de la dynamique des microtubules (Carlier *et al.*, 1997; Lange *et al.*, 1988; Mandelkow *et al.*, 1988; Marx et Mandelkow, 1994; Palmer *et al.*, 1982; Spann *et al.*, 1987). Certains auteurs ont même suggéré qu'il doive exister des facteurs de catastrophes endogènes dans les solutions microtubulaires pour expliquer les oscillations synchronisées des microtubules (Marx et Mandelkow, 1994).

Globalement, nous observons qu'une augmentation de la concentration en tubuline compétente pour l'assemblage (tubuline-GTP) fait passer de solutions où les microtubules sont peu nombreux et peu dynamiques, à des solutions où les microtubules sont très nombreux et très dynamiques. Les solutions de microtubules possèdent donc toutes les propriétés pour effectuer la transition d'une dynamique de type interphasique avec de longs microtubules stables à une dynamique de type mitotique caractérisée par des microtubules courts, nombreux et très dynamiquement instables (Belmont *et al.*, 1990; Verde *et al.*, 1990). Cette capacité intrinsèque des réseaux microtubulaires pourrait être exploitée par les systèmes de contrôle de la cellule lors des réorganisations du cytosquelette microtubulaire au cours du cycle cellulaire.

Les résultats de cette étude mettent en évidence l'importance des oligomères de tubuline dans le contrôle de la dynamique des microtubules. La recherche et l'étude de ces oligomères font l'objet du chapitre suivant.

**Chapitre IV : Obtention
et caractérisation
d'oligomères de tubuline
stimulant la nucléation
des microtubules**

IV Obtention et caractérisation d'oligomères de tubuline stimulant la nucléation des microtubules

Nous prédisons (Chapitre III) que la dynamique des microtubules est contrôlée par des oligomères de tubuline. Ainsi, la nucléation des microtubules aurait lieu au moins en deux étapes. La première serait rapide et irréversible et consisterait en la formation d'oligomères stables de tubuline. Puis, environ 6 de ces oligomères s'assembleraient pour former un microtubule. De plus, nous montrons qu'il existe dans les solutions de microtubules assemblés *in vitro* des facteurs de catastrophes, qui sont sans doute des oligomères de tubuline. Dans les solutions de microtubules *in vitro*, il existerait donc au moins deux catégories d'oligomères de tubuline. Nous ne pouvons toutefois pas exclure que les mêmes oligomères stimulent la nucléation et le désassemblage. D'ailleurs, la formation des oligomères contrôlant la nucléation et des oligomères contrôlant le désassemblage semble liée, comme l'indique la symétrie des courbes d'assemblage / désassemblage.

Nous avons cherché à stabiliser des oligomères de tubuline interférant avec la réaction d'assemblage et désassemblage des microtubules, en particulier avec la nucléation. Pour cela, nous avons produit des « amorces » de microtubules par pontage covalent de fragments de microtubules et nous avons testé leur capacité à stimuler la nucléation des microtubules.

Plusieurs auteurs ont utilisé des conditions voisines pour produire des « amorces » de microtubules. Le principe est d'assembler de la tubuline en microtubules, puis de désassembler partiellement ces microtubules. Les microtubules sont cassés par des passages répétés à travers une seringue. Enfin, ces fragments de microtubules sont stabilisés par pontage covalent (Koshland *et al.*, 1988). Les fragments de microtubules ainsi obtenus sont stables et collectés par centrifugation puis repris en solution. Les observations en microscopie électronique montrent que les solutions ainsi préparées contiennent des microtubules mesurant environ 1 μm (Fanara *et al.*, 1999; Symmons *et al.*, 1996). Ces solutions de fragments de microtubules stimulent l'assemblage des microtubules dans des conditions où il n'y a pas d'assemblage spontané. Les microtubules s'allongent à partir des fragments de microtubules (Symmons *et al.*, 1996). En modifiant les protocoles de stabilisation de microtubules par pontage covalent, nous avons obtenu des conditions de pontage modéré, permettant de stabiliser des oligomères de tubuline plutôt que des fragments de microtubules.

IV.1 Obtention d'oligomères de tubuline stimulant la nucléation

IV.1.1 Pontage covalent modéré de microtubules

Les premières études décrivant la production d'amorces (Koshland *et al.*, 1988) utilisaient des concentrations assez faibles d'agent pontant. Les microtubules étaient stabilisés

par traitement pendant 15 minutes en présence de 1,33 mM d'EGS (Ethylèneglycol-bis-(succinimidylsuccinate)). En se fondant sur ces premiers résultats, Symmons *et al.*, 1996 puis Fanara *et al.*, 1999 ont modifié le protocole original, en augmentant la concentration en EGS respectivement à 3,3 puis 3,4 mM. Nous avons mis au point une procédure de pontage covalent des microtubules à partir des résultats de la littérature. Pour cela, de la tubuline à la concentration de 100 μM est assemblée en présence de GTP 1 mM, de glycérol 10% v : v et à 37°C pendant 20 minutes. Les microtubules ainsi formés sont alors traités par ajout de 3,4 mM d'EGS pendant 5 minutes à 37°C. Le pontage est donc modéré puisque le traitement à l'EGS est plus court que dans les études antérieures. Puis l'EGS est neutralisé par traitement pendant 1 heure en présence de glutamate.

La solution est ensuite diluée 10 fois afin de diluer le glycérol présent dans la réaction d'assemblage et faciliter la sédimentation des petites particules. Puis les produits de pontage sont centrifugés à très haute vitesse (200000 g) pendant une heure. On obtient alors un culot de centrifugation, qui est repris en solution dans du tampon PEM. La solution, dont la concentration en protéine est d'environ 10 mg.mL^{-1} peut alors être stockée à -80°C. Le rendement de cette procédure est très faible, puisque seulement 10% de la tubuline initiale est collectée dans le culot. Nous avons ensuite caractérisé ces solutions, tout d'abord en testant leur capacité à stimuler la nucléation des microtubules.

IV.1.2 Stimulation de l'assemblage de la tubuline

Dans le tampon PEM à 37°C, nous avons vérifié que la PC-tubuline ne s'assemble pas en microtubules en dessous d'une concentration de 25 μM en tubuline. Pour cela, de la PC tubuline à 25 μM a été incubée à 37°C en présence de GTP 1 mM pendant 30 minutes. Puis après 30 minutes, l'absence de microtubules dans la solution a été vérifiée par centrifugation sur lamelle et immunofluorescence indirecte. Pour évaluer la capacité des solutions d'amorces à stimuler la formation de microtubules, nous avons testé l'effet de l'ajout de quantités croissantes d'amorces à des solutions de tubuline-GTP à la concentration de 18 μM (Figure IV-1). On observe qu'en l'absence d'amorces, il n'y a effectivement pas d'assemblage (résultat non présenté). En revanche, avec 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ d'amorces, la tubuline-GTP à la concentration de 18 μM s'assemble en microtubules. Plus on augmente la quantité d'amorces, plus l'assemblage observé est rapide. Le maximum d'assemblage est en effet atteint à 10 minutes pour 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ d'amorces, 8 minutes pour 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et 7 minutes pour 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. La quantité maximale de tubuline assemblée en microtubules augmente aussi avec la quantité d'amorces ajoutées, passant de 1 μM à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ à 1,8 μM à 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

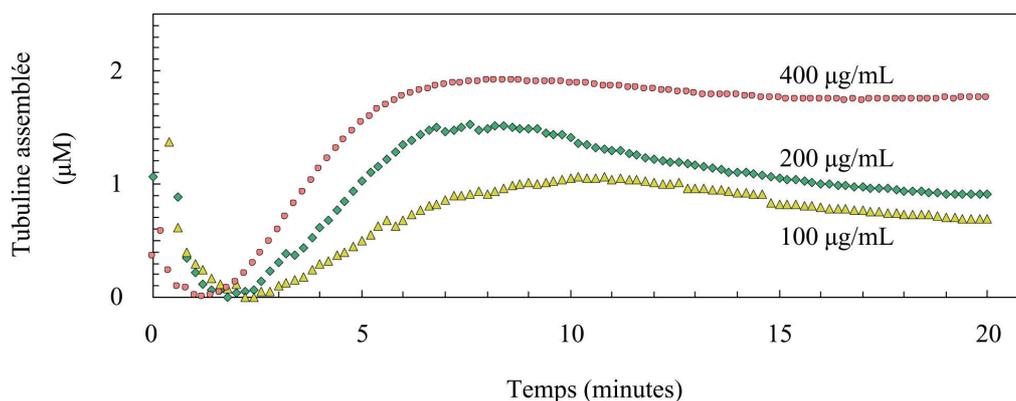


Figure IV-1 : Effet de l'ajout de quantités croissantes d'amorces sur l'assemblage de tubuline-GTP en dessous de la concentration critique. De la tubuline-GTP ($18 \mu\text{M}$) a été incubée à 35°C dans du tampon PEM en présence de trois concentrations d'amorces de microtubules (indiquée sur chaque courbe). L'assemblage de la tubuline a été mesuré au cours du temps par turbidimétrie (absorbance à 350 nm). La valeur de l'absorbance a été convertie en concentration de tubuline assemblée en microtubules.

Cette stimulation de l'assemblage de la tubuline sous la concentration critique ne peut pas être due à la présence de tubuline dimérique dans les solutions d'amorces. En effet, même si ces solutions n'étaient constituées que de tubuline dimérique, la concentration totale en tubuline serait au maximum de $22 \mu\text{M}$, alors que la concentration critique est de $25 \mu\text{M}$ dans nos conditions (en présence d'un excès de GTP).

Les solutions préparées à partir de microtubules pontés covalamment de façon modérée sont donc capables de stimuler l'assemblage de la tubuline en dessous de la concentration critique. Les amorces obtenues ont été caractérisées, tout d'abord par microscopie.

IV.1.3 Absence de microtubules dans les solutions stimulant la nucléation

La première caractérisation a été réalisée par centrifugation des amorces sur lamelles de verre et immunofluorescence indirecte. Pour cela, le protocole utilisé pour mesurer les longueurs de microtubules a été utilisé (chapitres II et III). L'observation au microscope optique des solutions d'amorces centrifugées sur lamelles révèle une absence quasi-totale de microtubules. Au plus fort grossissement, le marquage obtenu révèle des amas, dont la nature et la structure ne sont pas accessibles par la microscopie optique. Ainsi, les conditions de pontage modéré conduisent à la formation de structures beaucoup plus petites que celles des études précédentes (Fanara *et al.*, 1999; Symmons *et al.*, 1996).

Dans un second temps, nous avons étudié les solutions d'amorces à la fois en microscopie électronique à transmission et par diffusion de lumière afin de déterminer la structure des amorces de microtubules. Les études en diffusion de lumière nécessitent des solutions très propres, ne contenant pas de poussières en suspension. Il est donc nécessaire de

filtrer les solutions avant de les observer, sur filtre Millipore 0,1 μm . Nous avons donc testé l'effet de la filtration sur la capacité des solutions d'amorces à stimuler l'assemblage.

Pour cela, des solutions d'amorces ont été préparées. Une partie des ces solutions a été soumise à filtration sur Millipore 0,1 μm , puis le filtrat a été centrifugé à très haute vitesse (200000 g) pendant 1 heure pour récupérer les particules. Le culot obtenu est repris dans un petit volume et sa capacité à stimuler l'assemblage de PC-tubuline en dessous de la concentration critique a été comparée à la solution d'amorces non filtrée. Les propriétés des deux solutions ne peuvent pas être distinguées (résultat non présenté). Ainsi, les amorces préparées dans nos conditions sont des fragments de microtubules de taille inférieure à 100 nm, soit dix fois plus petites que celles obtenues par Symmons *et al.*, 1996. Les microtubules étant constitués de 1625 dimères de tubuline par micromètre, les fragments de microtubules obtenus contiennent au maximum 170 dimères. Dans la suite de cette étude et compte tenu de ces résultats, les solutions d'amorces sont systématiquement filtrées sur Millipore 0,1 μm .

IV.2 Caractérisation des amorces de nucléation

Les solutions ont été étudiées d'une part par diffusion de lumière au CERMAV en collaboration avec le Dr Eric Bühler, et d'autre part en microscopie électronique à transmission après coloration négative en collaboration avec Odile Valiron au laboratoire.

IV.2.1 Etude en diffusion de lumière

La diffusion de lumière informe sur les particules en suspension : taille, forme, interactions inter- et intramoléculaires. De plus, la diffusion quasi-élastique (ou dynamique) de la lumière permet de suivre au cours du temps les propriétés des solutions.

IV.2.1.1 Diffusion dynamique de la lumière

Les solutions d'amorces ont été étudiées à la concentration de 750 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, et à 20°C, dans du tampon PEM. La fonction d'autocorrélation de l'intensité diffusée est mesurée pendant 100 s à 90° et à 20°C. Puis les temps de relaxation caractéristiques de la fonction d'autocorrélation sont déduits par la méthode de Contin (Schmitz, 1990). On obtient autant de temps de relaxation qu'il y a de catégories de tailles de particules. Ces temps caractéristiques donnent accès au rayon hydrodynamique des particules en solution, caractéristique des propriétés de diffusion des particules.

Dans le cas des solutions d'amorces, l'analyse de Contin fait ressortir deux temps de relaxation parfaitement distincts (figure IV-2a), correspondant à deux tailles différentes. Une première catégorie de particules présente un rayon hydrodynamique (R_H) de 7,9 nm. Cette première catégorie de particules correspond très probablement à des dimères de tubuline, dont la taille est de 8 nm. La seconde catégorie de particules présente un R_H de 42 nm. Quatre

solutions d'amorces ont été examinées en diffusion dynamique de lumière, avec les mêmes résultats. Les solutions d'amorces ne contiennent donc que deux types de particules : des dimères de tubuline ($8,4 \pm 0,6$ nm) et des assemblages de tubuline dont le rayon hydrodynamique est de 42 ± 6 nm.

Les proportions d'amorces et de dimères de tubuline pourraient être déduites des résultats de la figure IV-2b : chaque catégorie de particule participe à l'intensité diffusée en fonction de sa concentration massique. Toutefois, ce calcul nécessite de connaître l'incrément réfractif du tampon PEM, ou bien de connaître la masse molaire de chacune des deux catégories de particules. La suite de cette étude a permis de connaître la taille exacte et la structure de chacune des catégories de particules et d'en déduire les concentrations molaires des amorces et des dimères de tubuline (voir la discussion). En revanche, nous avons constaté que cette proportion, liée au rapport A_{fast}/A_{slow} de la figure IV-2b, ne variait pas pour les quatre solutions d'amorces observées.

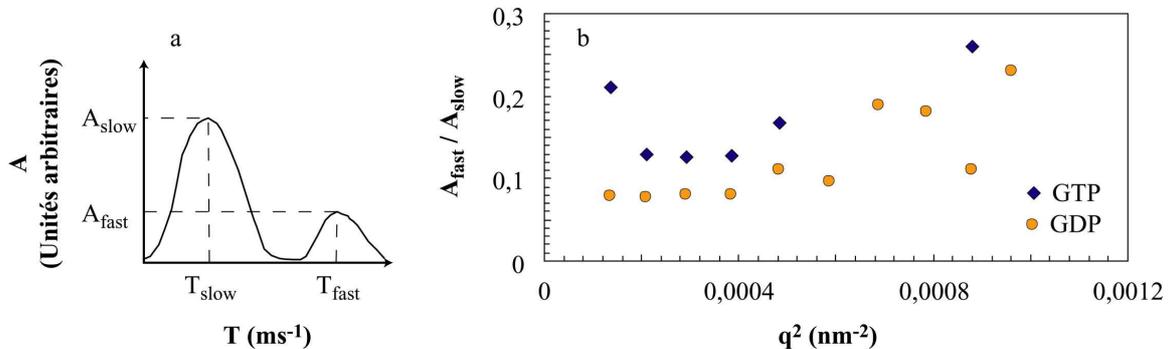


Figure IV-2 : Analyse des solutions d'amorces par diffusion dynamique de la lumière. Une solution d'amorces ($750 \mu\text{g.mL}^{-1}$) dans du tampon PEM et en présence de GTP 1 mM ou de GDP 1 mM a été étudiée par diffusion dynamique de la lumière à 90° . La fonction d'autocorrélation de l'intensité diffusée à 90° a été enregistrée par périodes de 100 s et analysée par la méthode de Contin. (a) Exemple de spectre des intensités diffusées après analyse par la méthode de Contin. La proportion de l'intensité diffusée par chacune des catégories de particules est A , représentée en fonction du temps de relaxation des différentes particules. Les deux temps de relaxation ont permis de calculer les rayons hydrodynamiques de ces particules. (b) A_{fast}/A_{slow} en fonction de q^2 . Le rapport A_{fast}/A_{slow} permet de connaître la proportion de chacune des particules dans la solution quand l'incrément réfractif de la solution, ou la masse molaire des différentes catégories de particules sont connus (voir plus loin).

IV.2.1.2 Diffusion statique de la lumière

Les mêmes solutions ont été étudiées par diffusion statique de la lumière. L'intensité diffusée par la solution a été mesurée entre 20° et 135° , tous les 5 degrés. L'intensité moyenne sur 100 s a été prise en compte. L'inverse de l'intensité a été reportée en fonction de $1/q^2$ (voir chapitre II et figure IV-3). Les points s'alignent sur une droite dont la pente est fonction du rayon de giration (R_G) des particules en solution et vaut $R_G^2/3$.

En présence de GTP 1 mM, la pente de la droite de régression conduit à un rayon de giration de 48 nm. En présence de GDP 1 mM, le rayon de giration est de 50,2 nm. Les particules en solution sont donc de très petite taille et il n'est pas étonnant qu'elles ne soient pas visibles en microscopie optique. La valeur du rayon de giration obtenue est précise à 3-4 nm près. La différence de tailles observée en présence de GTP ou de GDP n'est donc pas significative.

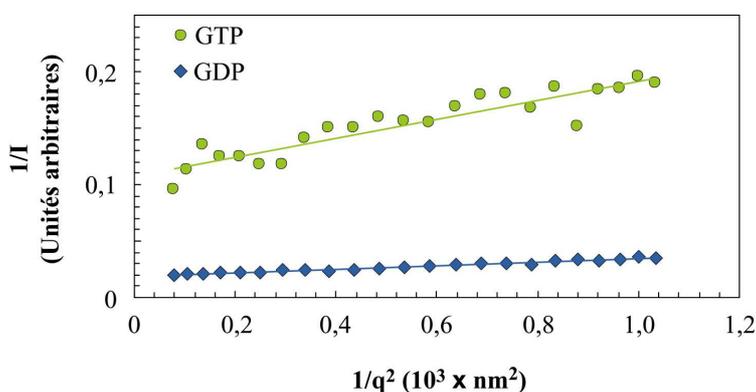


Figure IV-3 : Analyse des solutions d'amorces par diffusion statique de la lumière. Une solution d'amorces ($750 \mu\text{g.mL}^{-1}$) dans du tampon PEM en présence de GTP 1 mM ou de GDP 1 mM a été étudiée par diffusion statique de la lumière. L'intensité diffusée dans différentes directions (de 20° à 135° , tous les 5 degrés) a été mesurée. On a reporté l'inverse de l'intensité diffusée (en unités arbitraires) en fonction de $1/q^2$ (en nm^2 , qui dépend de l'angle d'observation). Les points s'alignent sur une droite dont la pente est fonction du rayon hydrodynamique des particules en solution.

IV.2.1.3 Combinaison des deux méthodes

Le rapport du rayon hydrodynamique sur le rayon de giration donne des indications quant à la forme des particules. En effet, le rapport R_H/R_G prend des valeurs caractéristiques de 1,29 pour une sphère dure, de 0,88 pour une chaîne gaussienne et est inférieur à 0,88 pour une chaîne semi-rigide. Il est encore plus faible pour un bâtonnet rigide (Schmitz, 1990). Ici le rapport R_H/R_G vaut 0,771 en présence de GTP et 0,996 en présence de GDP. Les particules de taille comprise entre 35 et 50 nm sont donc flexibles (rapport inférieur à 1,29).

IV.2.1.4 Etude au cours du temps par diffusion dynamique de la lumière

Des solutions d'oligomères ($750 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ont été étudiées à 35°C en présence de GTP 1 mM ou en absence de GTP. La fonction d'autocorrélation de l'intensité diffusée à 90° a été mesurée au cours du temps par périodes de 100 s. Au temps initial, on retrouve les deux catégories de particules de rayon hydrodynamique 8 et 40 nm, correspondant aux dimères et aux oligomères de tubuline respectivement. Ces valeurs ne changent pas au cours du temps, que ce soit en présence de GTP ou non. Aucun autre temps de relaxation ne peut être obtenu. Ainsi, les amorces et les dimères de tubuline présents ne s'assemblent pas massivement pour

former des agrégats de plus grande taille, aux concentrations utilisées ($750 \mu\text{g.mL}^{-1}$). On ne peut toutefois pas exclure qu'une toute petite fraction d'oligomères se combinent pour former des agrégats de plus grande taille. La diffusion de lumière ne permettrait pas de détecter la formation en très faible concentration de tels agrégats.

Nous avons également suivi l'évolution au cours du temps de solutions de tubuline ($18 \mu\text{M}$) en présence d'oligomères ($300 \mu\text{g.mL}^{-1}$) incubées à 25°C en présence de GTP 1 mM . La température de 25°C a été choisie car la tubuline s'assemble en microtubules, mais avec une cinétique plus lente qu'à 35°C . L'état stationnaire est atteint en environ 30 minutes à 25°C , contre 7 minutes à 35°C . Les mesures de la fonction d'autocorrélation de l'intensité diffusée qui sont réalisées par période de 100 s sont ainsi facilitées. La fonction d'autocorrélation de l'intensité diffusée à 90° a été mesurée comme précédemment au cours du temps (résultats préliminaires, non présentés). On obtient encore deux tailles correspondant aux dimères et aux oligomères. Puis dans les premières minutes, une troisième catégorie de particules apparaît, de rayon hydrodynamique proche de 100 nm. L'intensité et la largeur de ce pic deviennent de plus en plus importantes et le pic se décale vers les grandes valeurs de rayon hydrodynamique. Les valeurs de rayon hydrodynamique pour cette catégorie de particules deviennent trop importantes pour les études en diffusion de lumière et sont sous-estimées. Ces particules de très grande taille sont probablement les microtubules. Les premières particules formées lors de l'assemblage semblent donc être des agrégats de 100 nm environ, qui se transformeraient rapidement en microtubules. Ces particules sont probablement formées par assemblage d'oligomères et de tubuline dimérique, puisqu'elles ne sont pas observées dans les solutions d'oligomères en absence de tubuline libre.

IV.2.2 Etude en microscopie électronique à transmission par coloration négative

Cette étude a été menée par Odile Valiron. Des solutions d'amorces de microtubules ont été déposées sur des grilles de microscopie électronique et colorées à l'acétate d'uranyle. Les grilles ont ensuite été observées au microscope électronique à transmission. Des solutions d'amorces non filtrées sur Millipore $0,1 \mu\text{m}$ ont également été observées.

La figure IV-4 illustre les observations réalisées. Les solutions d'amorces contiennent des structures mesurant 30 à 40 nm, se présentant comme de courts filaments. On n'observe jamais de fragments de microtubules, ni de feuillettes de tubuline. Les amorces décrites en diffusion de lumière sont donc des oligomères de tubuline se présentant sous forme de courts assemblages linéaires de tubuline. Dans les solutions non filtrées, on observe en plus des oligomères de 30-40 nm, des agrégats de forme variable et de taille supérieure à 100 nm. On observe également des fragments de microtubules (résultat non présenté).

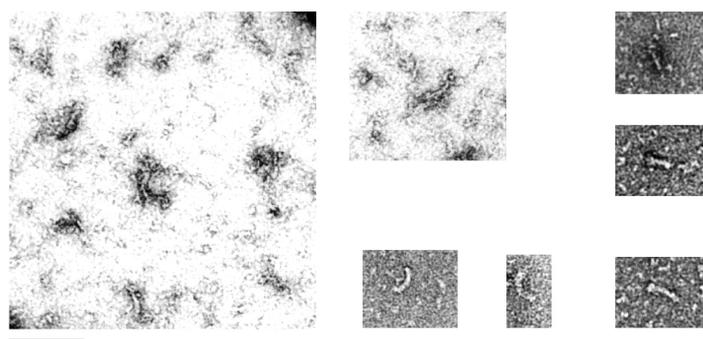


Figure IV-4 : Observation des solutions d'amorces par microscopie électronique à transmission après coloration négative. Des solutions d'amorces ont été déposées sur grilles de microscopie électroniques, séchées, et colorées à l'acétate d'uranyle. Les grilles ont ensuite été observées en microscopie électronique à transmission. La barre d'échelle représente 50 nm. Clichés Odile Valiron.

Les solutions d'amorces contiennent donc de la tubuline dimérique en proportion fixe, et des oligomères de tubuline de 35 à 40 nm. Ce sont ces oligomères qui stimulent la nucléation des microtubules. Le protocole de pontage covalent modéré suivi par une filtration sur Millipore 0,1 μm permet donc de purifier de façon reproductible des oligomères de tubuline très homogènes en taille. Il semble que ces oligomères soient constitués d'assemblages linéaires de tubuline. Les oligomères peuvent être constitués soit par une association longitudinale de dimères de tubuline (comme dans un protofilament), soit par une association latérale de dimères. Pour préciser la structure des oligomères, nous avons étudié leurs propriétés de liaison des nucléotides.

IV.2.3 Etude des propriétés de liaison des nucléotides

La tubuline β lie de façon réversible le GTP et le GDP avec une constante de dissociation variable selon le tampon, de 10 à 1000 nM. Cette constante de dissociation augmente quand il y a moins de Mg^{2+} (Correia *et al.*, 1987). Dans le tampon PEM qui contient 1 mM de MgCl_2 et 1 mM d'EGTA, il y a très peu de Mg^{2+} libre et la constante de dissociation de la tubuline et du GTP est voisine de 100 nM (Correia *et al.*, 1987). Toutefois dans les microtubules, le site de liaison des nucléotides se situe à l'interface entre la tubuline β d'un dimère et la tubuline α du dimère suivant (voir chapitre I et discussion). Les nucléotides ne sont donc pas échangeables entre la solution et les sous-unités assemblées en microtubules, sauf à l'extrémité *plus* d'un microtubule où la tubuline β est exposée (Dustin, 1984; Mitchison, 1993). Ainsi, l'étude de l'échange des nucléotides entre les oligomères et la solution donne des indications sur les interactions entre les dimères de tubuline à l'intérieur des oligomères (voir la discussion).

Des oligomères, préparés en présence de GTP non radioactif, ont été incubés en présence de GTP radioactif. Puis le GTP libre a été éliminé par filtration sur Biogel P30. La quantité de protéine et la quantité de GTP élués ont été mesurées. Le GTP élué correspond au

GTP lié, le GTP libre restant dans le Biogel P30. Les résultats de trois expériences indépendantes sont présentés dans le tableau IV-1. On observe que 91 à 98,8% des dimères ont échangé le GTP non radioactif lié lors de la préparation contre le GTP radiomarqué de la solution. Cela signifie que presque tous les dimères peuvent échanger les nucléotides avec la solution.

De plus, nous avons réalisé un diagramme de Scatchard en faisant varier la quantité de GTP total et en mesurant la quantité de GTP lié. Le résultat est présenté dans la figure IV-5 où la courbe en trait plein représente la droite de régression des points expérimentaux. La pente de ce diagramme est égale à $-1/K_d$ (K_d : constante de dissociation) et l'abscisse à l'origine définit la quantité maximale de GTP lié par les oligomères. On obtient ici $K_d = 17 \mu\text{M}$. L'abscisse à l'origine vaut $9,3 \mu\text{M}$, alors que la solution contenait au total $10 \mu\text{M}$ de tubuline. Environ 93% des dimères de tubuline peuvent donc échanger le GTP. On retrouve qu'il y a environ un site de liaison du GTP par dimère de tubuline. L'échange de GTP a lieu avec une affinité d'environ $17 \mu\text{M}$, alors que le dimère de tubuline a une affinité de l'ordre de 100 nM dans ces conditions (Correia *et al.*, 1987). De plus, l'échange du GTP entre les dimères de tubuline libres et la solution est très rapide (Dustin, 1984), alors qu'ici il est plus lent entre les oligomères et la solution. L'échange n'est en effet total qu'après environ 15 minutes (résultat préliminaire, non présenté). Les oligomères ont donc un K_d vis à vis du GTP plus élevé que les dimères libres, et échangent moins vite le GTP avec la solution. Sans doute le pontage covalent gêne-t-il l'échange du GTP entre les oligomères et la solution.

[Oligomères] ($\mu\text{g/mL}$)	[GTP total] (mM)	[GTP lié] (mM)	% de dimères ayant échangé le GTP
125	0,25	$1,23 \pm 0,12$ ($n = 4$)	98,4%
250	0,25	$2,39 \pm 0,14$ ($n = 4$)	95,6%
250	2,75	$2,28 \pm 0,09$ ($n = 3$)	91,2%

Tableau IV-1 : Echange de nucléotides entre les oligomères de tubuline et la solution. Des solutions d'oligomères aux concentrations indiquées (première colonne) ont été incubées pendant 15 minutes dans du tampon PEM à 4°C en présence de GTP radiomarqué (concentration indiquée dans la deuxième colonne). Les nucléotides libres ont été éliminés par filtration sur Biogel P30 et la quantité de nucléotides liés a été mesurée par scintillation (troisième colonne : moyenne \pm écart type, entre parenthèses, nombre de mesures). Chaque dimère de tubuline ayant un site de liaison échangeable du GTP, le pourcentage de dimères de tubuline ayant échangé le nucléotide lié contre le GTP radiomarqué en solution a été calculé (dernière colonne).

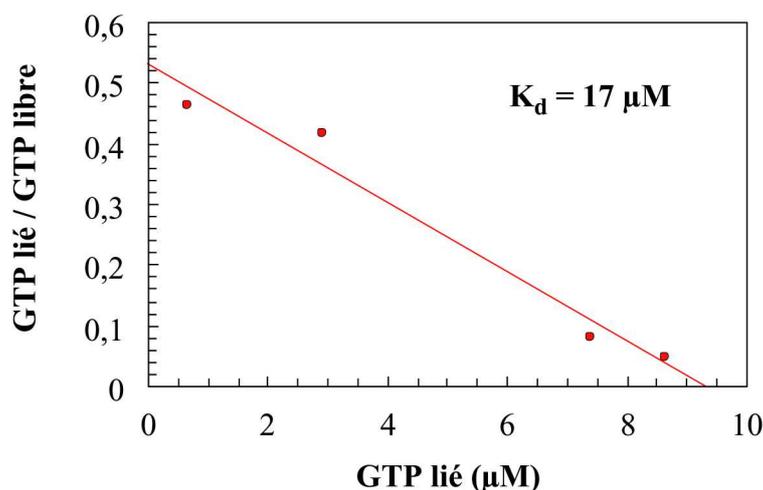


Figure IV-5 : Analyse de Scatchard de la liaison du GTP par les oligomères. Une solution d'oligomères de tubuline (1 mg.mL^{-1}) a été incubée pendant 15 minutes à 4°C dans du tampon PEM en présence de concentrations variables de $8\text{-}^3\text{H-GTP}$. Le GTP libre a été éliminé par filtration sur Biogel P30 et la quantité de GTP lié a été mesurée par scintillation. La quantité de GTP libre a ensuite été calculée en soustrayant la quantité de GTP lié à la quantité initiale de GTP, et le rapport GTP lié/GTP libre a ainsi été déterminé. Un diagramme de Scatchard est présenté : en trait plein est représentée la droite de régression des points expérimentaux. Sa pente vaut $-1/K_d$, où K_d est la constante de dissociation du GTP de la tubuline. L'extrapolation de la droite de régression vers l'axe des abscisses donne la quantité maximale de GTP lié par les oligomères de tubuline.

IV.3 Exposant de nucléation

Nous avons prédit que la nucléation des microtubules commençait par une étape très rapide et irréversible : la formation d'oligomères de tubuline, en quantité proportionnelle à la concentration initiale en tubuline-GTP. Puis dans un second temps, environ 6 de ces oligomères s'assembleraient pour former un nouveau microtubule (chapitre III). Ces résultats ont été obtenus en mesurant le taux de nucléation de nouveaux microtubules pour différentes concentrations initiales en tubuline-GTP. Pour déterminer combien d'oligomères sont nécessaires à la formation d'un nouveau microtubule, nous avons réalisé une étude similaire, mais en faisant varier non pas la concentration initiale en tubuline-GTP, mais la concentration en oligomères. Nous avons mesuré pour ces différentes concentrations initiales en oligomères la quantité de tubuline assemblée en microtubules au cours du temps, ainsi que la longueur moyenne des microtubules. Ces mesures ont été réalisées avec $18 \mu\text{M}$ de tubuline-GTP sans GTP libre, en présence de 200, 300 ou $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'oligomères. Les résultats sont présentés dans la figure IV-6.

Le maximum d'assemblage est atteint respectivement à 10, 9 et 9 minutes pour 200, 300 et $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'oligomères. La quantité maximale de tubuline assemblée augmente avec la concentration en oligomères. Les longueurs ont été mesurées pendant les six premières

minutes de l'assemblage : la longueur moyenne des microtubules augmente presque linéairement au cours du temps, à une vitesse de $2 \mu\text{m}.\text{minute}^{-1}$. Ce résultat est en accord avec d'autres études au voisinage de la concentration critique en tubuline. Ainsi, la vitesse d'élongation des microtubules est de 1 à $2 \mu\text{m}.\text{minute}^{-1}$ pour des microtubules assemblés à partir d'axonèmes en présence de $20 \mu\text{M}$ de tubuline (Mitchison et Kirschner, 1984). Toutefois, la longueur moyenne des microtubules augmente beaucoup moins vite que ce que nous avons décrit pour des concentrations nettement supérieures à la concentration critique. La longueur moyenne augmente en effet de $2 \mu\text{m}$ par minute environ, contre $8,9 \mu\text{m}.\text{minute}^{-1}$ loin au-dessus de la concentration critique (chapitre III). Il semble donc que la tubuline libre limite ici la vitesse d'élongation des microtubules.

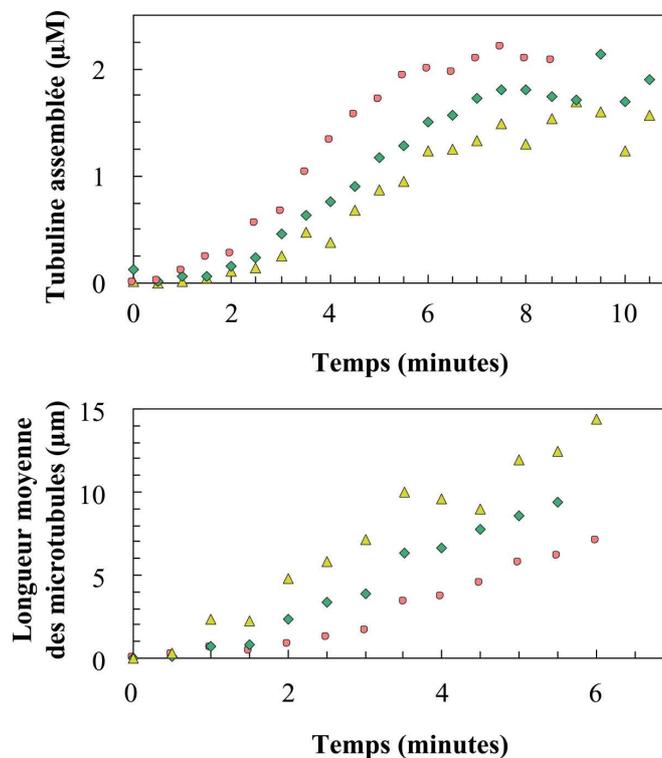


Figure IV-6 : Assemblage de tubuline-GTP sans GTP libre en présence de différentes concentrations d'oligomères. De la tubuline-GTP ($18 \mu\text{M}$) a été incubée à 35°C dans du PEM. Aux temps indiqués, la réaction a été stoppée par dilution en présence de saccharose et les microtubules ont été pontés de façon covalente par de la glutaraldéhyde. Cercles oranges : $400 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$; diamants verts : $300 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$; triangles jaunes : $200 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. (a) Concentration de tubuline assemblée au cours du temps, mesurée par dosage sur filtres (voir chapitre II). (b) Longueurs moyennes des microtubules au cours du temps, mesurées en microscopie optique après immunofluorescence indirecte.

A partir des résultats de la figure IV-6, nous avons calculé la concentration en nombre de microtubules (figure IV-7). On observe que pour les concentrations en oligomères de 400 et $300 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, le nombre de microtubules augmente très rapidement avant de rester pratiquement constant. Le nombre d'oligomères présents dans la solution limite donc la

nucléation, puisque le nombre de microtubules atteint un plateau. Ainsi, les oligomères sont très rapidement consommés. La réaction d'assemblage comporte donc ici deux phases : tout d'abord la formation de microtubules, qui consomme très rapidement les oligomères, puis l'élongation des microtubules formés. La nucléation des microtubules à partir des oligomères a donc lieu au début de la réaction (environ une minute, figure IV-7).

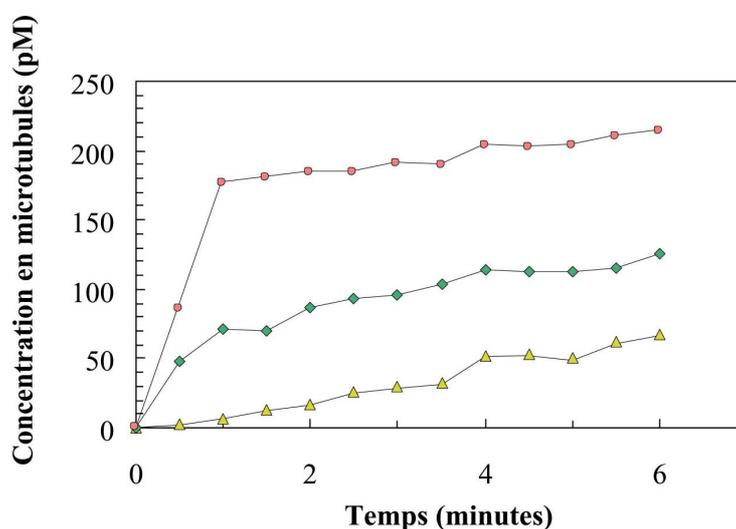


Figure IV-7 : Concentration en nombre de microtubules au cours du temps en présence de différentes concentrations d'oligomères. La concentration en nombre de microtubules a été calculée à partir de la quantité de tubuline assemblée en microtubules et de la longueur moyenne des microtubules, en considérant qu'un micromètre de microtubule contient 1625 dimères (voir chapitres II et III). Cercles oranges : 400 µg.mL⁻¹ ; diamants verts : 300 µg.mL⁻¹ ; triangles jaunes : 200 µg.mL⁻¹.

Les pentes initiales des courbes d'évolution de la concentration en nombre de microtubules ont été déterminées. Elles ont été reportées en fonction de la concentration en oligomères, dans un graphe à coordonnées logarithmiques (figure IV-8). La loi d'action de masse nous indique que la pente β de ce graphe est le nombre d'oligomères nécessaires pour former un nouveau microtubule. La pente vaut ici $\beta = 4,2$. La nucléation à partir des oligomères nécessite donc l'interaction de quatre oligomères environ.

Les solutions d'oligomères contiennent en plus des oligomères, de la tubuline dimérique. Les variations observées dans les figures IV-6, IV-7 et IV-8 pourraient être dues à l'ajout de quantités croissantes de tubuline. Pour exclure cette hypothèse, les mêmes mesures que dans les figures IV-6, IV-7 et IV-8 ont été réalisées avec 300 µg.mL⁻¹ d'oligomères, et 16, 18 ou 20 µM de tubuline-GTP (résultats non présentés). Les différences observées entre ces trois séries de courbes sont très faibles, et n'ont rien de comparable avec les différences observées dans les figure IV-6 et IV-7. La pente β de la figure IV-8 montre donc qu'il faut environ quatre oligomères pour former un nouveau microtubule.

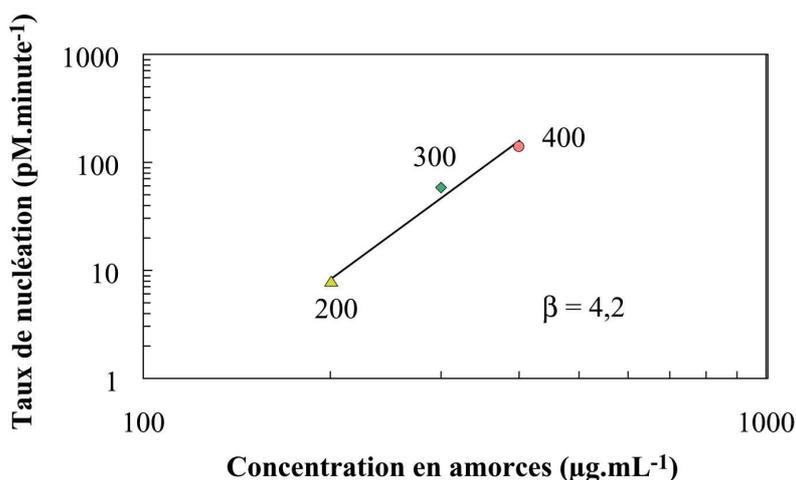


Figure IV-8 : Exposant de nucléation par les oligomères. Les pentes initiales des courbes de concentration en nombre de microtubules ont été reportées en fonction de la concentration initiale en amorces dans un graphe à coordonnées logarithmiques. La pente β de ce graphe est égale au nombre d'amorces nécessaires pour former un microtubule (voir le texte). Cercles oranges : 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; diamants verts : 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; triangles jaunes : 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Nous avons voulu savoir quelle proportion d'oligomères participaient à la nucléation de nouveaux microtubules. Pour cela, nous avons comparé la concentration en oligomères et la concentration en nombre de microtubules formés lors de la réaction. La concentration en oligomères peut seulement être estimée, puisque les solutions d'oligomères contiennent une proportion inconnue de dimères sans doute voisine d'un tiers de la tubuline totale. Or les oligomères semblent constitués par l'assemblage latéral d'une rangée de dimères (voir la discussion). Un dimère mesure environ 8 nm par 4 nm. Il y a donc environ 10 dimères par oligomères. Connaissant les tailles des différentes particules en solution, les résultats de diffusion dynamique de la lumière (figure IV-2b) permettent d'estimer la proportion de dimères et d'oligomères. Chacune des catégories de particules contribue en effet à l'intensité diffusée en proportion de sa concentration en masse. La concentration en masse d'une particule est égale au produit de la masse molaire de la particule et de la concentration molaire de la particule considérée. Le calcul montre que les solutions contiennent environ 65% de tubuline sous forme d'oligomères et 35% de tubuline sous forme de dimères.

Examinons la réaction d'assemblage à 18 μM de tubuline-GTP et 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ d'oligomères. Si les solutions d'oligomères contiennent environ un tiers de tubuline sous forme de dimères, il reste 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ d'oligomères. Compte tenu que 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de tubuline représentent 2 μM de tubuline, et chaque oligomère étant constitué de 10 dimères, la solution contient finalement 0,2 μM d'oligomères. Puisqu'il faut quatre oligomères pour former un nouveau microtubule, il pourrait se former au maximum 50 nM de microtubules. Or nous observons qu'il ne se forme que 100 pM environ de microtubules (figure IV-7), soit 500 fois moins que ce qui pourrait se former. L'étape d'agrégation de quatre oligomères est

donc rarement productive. Or l'agrégation des oligomères pour former un nouveau microtubule nécessite la présence de tubuline libre (voir §IV.2.1.4) : peut-être cette étape consomme-t-elle une partie de la tubuline-GTP.

IV.4 Désassemblage

Nous avons obtenu des conditions de réaction pour lesquelles il n'y a pas de nucléation spontanée de microtubules. L'ajout d'amorces a permis de suppléer cette nucléation. Dans ces conditions où il semble ne pas se former spontanément d'oligomères de nucléation, se forme-t-il des oligomères stimulant le désassemblage ? Une solution tubuline-GTP (18 μM) en absence de GTP libre et en présence d'oligomères (300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) a été incubée à 35°C, et l'assemblage a été suivi par turbidimétrie (figure IV-1). On observe que la quantité de tubuline assemblée augmente au cours du temps, atteint un maximum puis se stabilise. La tubuline assemblée ne désassemble donc que très peu. Ainsi, dans des conditions où il n'y a pas de nucléation spontanée des microtubules, il n'y a pas non plus de désassemblage spontané. Toutefois, en refroidissant la solution à 4°C, les microtubules désassemblent complètement. Ces microtubules ne sont donc pas dénaturés.

Nous avons voulu savoir si les microtubules formés sont capables d'être dynamiques. Pour cela, de la tubuline (20 μM) a été assemblée en microtubules en présence de GTP radiomarqué (200 μM), jusqu'à atteindre le plateau. Puis du GTP non radiomarqué (3 mM) a été ajouté pour réaliser une chasse. Avant et après la chasse, des fractions de la solution ont été prélevées et la quantité de radioactivité incorporée dans les microtubules a été dosée sur filtre (voir chapitre II). On observe que la radioactivité spécifique des microtubules est abaissée de 40 à 45% après une heure de chasse. Les microtubules assemblés avec les oligomères peuvent donc échanger des sous-unités de tubuline avec la solution : ils sont donc dynamiques. Par comparaison, la même expérience a été réalisée au-dessus de la concentration critique, avec 50 μM de tubuline et sans oligomères de tubuline. L'assemblage a lieu spontanément et dans ce cas, environ 70% de la quantité de tubuline assemblée a été renouvelée après une heure de chasse. Les microtubules formés en présence d'oligomères de tubuline présentent donc des propriétés dynamiques comparables à celles de microtubules formés par nucléation spontanée, au-dessus de la concentration critique en tubuline. Ils semblent toutefois être renouvelés plus lentement, sans doute parce que la concentration en tubuline libre est plus faible.

IV.5 Discussion

Nous avons donc trouvé des conditions d'assemblage de la tubuline où il n'y a ni nucléation spontanée des microtubules, ni désassemblage spontané des microtubules. De plus, nous avons produit des amorces de microtubules qui ne sont pas des fragments de

microtubules mais des oligomères de tubuline. Nous avons donc mis au point des outils pour l'étude de la nucléation et du désassemblage des microtubules.

Des études antérieures avaient décrit la production d'amorces de microtubules par pontage covalent de microtubules (Fanara *et al.*, 1999; Koshland *et al.*, 1988; Symmons *et al.*, 1996). Ces auteurs ont utilisé des conditions de pontage par l'EGS qui stabilisaient des fragments de microtubules courts (environ 1 μm). Nous avons mis au point des conditions de pontage plus modérées suivies par une étape de filtration sur Millipore 0,1 μm , qui conduisent à la formation de fragments de microtubules qui sont des oligomères. Ces oligomères stimulent l'assemblage de microtubules dans des conditions où il n'y a pas d'assemblage spontané.

Les oligomères ont été caractérisés par étude en diffusion de lumière. Les solutions d'amorces contiennent des particules de 40 nm environ ainsi qu'une certaine quantité de tubuline dimérique. La taille des oligomères est très reproductible d'une expérience à l'autre, et la proportion de dimères est elle aussi très constante. Les conditions de pontage modéré et filtration éliminent tous les autres produits de la réaction.

En microscopie électronique à transmission, cette homogénéité des solutions est retrouvée. Des oligomères linéaires de tubuline sont observés, mesurant 40 nm environ. De tels oligomères peuvent avoir deux types de structures (figure IV-9). Ils peuvent soit être constitués par des arrangements latéraux de dimères de tubuline, soit par des arrangements longitudinaux de tubuline comme dans un protofilament. Les propriétés de liaison du GTP par la tubuline permettent de discriminer ces deux types d'arrangements. En effet, les dimères de tubuline lient du GTP sur la sous-unité β . Ce GTP peut être échangé avec le GTP libre. Toutefois, lorsque les dimères sont engagés dans une interaction longitudinale avec un autre dimère, la sous-unité α d'un dimère vient recouvrir le site de liaison du GTP sur la sous-unité β de l'autre dimère. Le GTP est alors bloqué et ne peut plus être échangé avec le GTP libre (figure IV-9a). Au contraire, si les dimères de tubuline sont associés latéralement, tous les dimères peuvent échanger le GTP lié avec le GTP libre (figure IV-9b). On peut également envisager des cas plus complexes où deux rangées de dimères associées latéralement sont associées pour former un feuillet (figure IV-9c). Dans ce cas, seule la moitié des dimères peuvent échanger le GTP lié avec le GTP libre. Dans notre cas, tous les dimères peuvent échanger le GTP lié contre le GTP libre. Les oligomères sont donc constitués par une rangée de dimères associés latéralement. On ne peut pas exclure toutefois que le pontage à l'EGS ne soit pas suffisant pour bloquer les échanges dans des assemblages longitudinaux de dimères. Pour le vérifier, il faudrait produire des oligomères constitués par association longitudinale de dimères, les ponter avec de l'EGS et vérifier s'ils peuvent ou non échanger le GTP lié contre le GTP libre. De tels oligomères sont produits lors du désassemblage des microtubules (Mandelkow *et al.*, 1991).

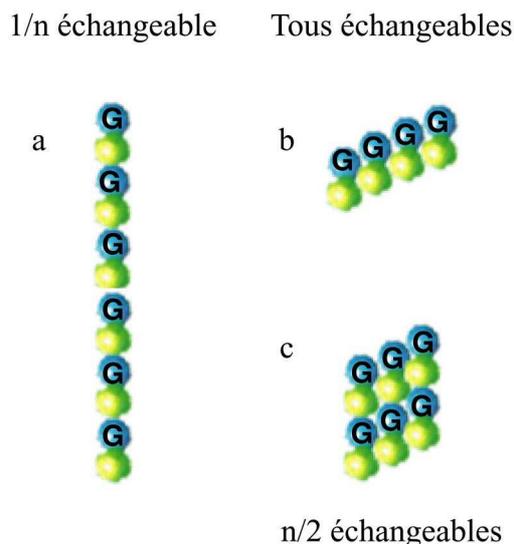


Figure IV-9 : Modèles d'oligomères de tubuline. Trois grands types d'oligomères peuvent être envisagés. L'hétérodimère est schématisé par deux sphères : la sphère jaune est la sous-unité α et la sphère bleue la sous-unité β . Le GTP échangeable est lié à la sous-unité β et est représenté par un G. (a) Oligomère formé par un assemblage longitudinal de dimères, comme dans un protofilament. Dans ce cas, seule la sous-unité β terminale peut échanger le GTP avec la solution. (b) Oligomère formé par assemblage latéral de dimères de tubuline. Dans ce cas, toutes les sous-unités β peuvent échanger le GTP avec la solution. (c) Oligomère en feuillet. Dans ce cas, seule la moitié des sous-unités β est libre et peut échanger le GTP avec la solution.

Nos oligomères de nucléation sont donc constitués par une association latérale de dimères. Puisque ces oligomères mesurent environ 40 nm et qu'un dimère mesure 4 nm de largeur, les oligomères sont donc constitués d'environ 10 dimères. Il s'agit à notre connaissance des premiers oligomères de tubuline stabilisés par pontage covalent et purifiés, qui stimulent la nucléation. Nous avons examiné quelles conditions permettaient la stabilisation de ces oligomères : il faut que le pontage reste modéré, c'est à dire de courte durée, ou alors à plus faible concentration que ce que nous avons utilisé. Il est remarquable qu'une seule catégorie d'oligomères soit produit par cette procédure. Sans doute les acides aminés exposés à la surface des microtubules ne permettent-ils pas de pontages longitudinaux avec l'EGS dans les conditions de pontage modéré.

Nous montrons qu'il faut environ 4 oligomères pour former un microtubule. Cette valeur n'est pas très différente de celle observée pour la nucléation spontanée (chapitre III) : nous montrons que dans ces conditions il en faut environ 6. Il est donc possible que les oligomères obtenus ici par désassemblage de microtubules se forment spontanément dans les solutions de tubuline. Nous aurions alors stabilisé et isolé le premier intermédiaire de nucléation des microtubules. De plus, la présence de tubuline-GTP semble nécessaire pour que les oligomères s'assemblent massivement en agrégats de plus grande taille. Il a d'ailleurs été proposé que la nucléation des microtubules ait lieu en deux étapes, avec formation

d'oligomères de tubuline, sur lesquels s'additionneraient ensuite des dimères de tubuline. Ces complexes grossiraient jusqu'à une taille critique, puis donneraient un microtubule (Voter et Erickson, 1984). Les oligomères formés par association latérale de dimères de tubuline stimulent la nucléation des microtubules : on peut donc supposer que la formation d'associations latérales de dimères est une étape limitante dans la formation d'un nouveau microtubule.

D'autres auteurs ont montré que la nucléation des microtubules passait par la formation d'oligomères linéaires de tubuline (Carlier *et al.*, 1997; Palmer *et al.*, 1982; Spann *et al.*, 1987). Toutefois, les auteurs n'avaient pas pu isoler ces oligomères ni préciser leur structure. Récemment, il a été montré que la phase de nucléation était associée à une hydrolyse de GTP sans formation de microtubules. Cette hydrolyse est sans doute liée à des processus de nucléation avortés. De plus, la présence de tubuline-GDP augmente cette hydrolyse liée à la nucléation. Les auteurs ont proposé que cette hydrolyse soit due à la formation d'oligomères linéaires de tubuline, formés par association longitudinale de dimères de tubuline. La formation de ces oligomères serait rapide et l'hydrolyse du GTP ne serait pas immédiate. Puis la nucléation se poursuivrait par addition latérale de dimères de tubuline et formation d'un feuillet. La tubuline-GTP a une conformation plutôt rectiligne, alors que la tubuline-GDP est incurvée. Ainsi, les oligomères linéaires formés par association longitudinale de tubuline-GTP seraient rectilignes et des oligomères contenant de la tubuline-GDP seraient courbés. Dans ce modèle, la formation de feuillets bidimensionnels de tubuline, précurseurs des microtubules, serait très défavorisée en présence de tubuline-GDP. En effet, la tubuline-GDP provoquerait une courbure des protofilaments et défavoriseraient les interactions latérales entre les protofilaments dans les feuillets (Carlier *et al.*, 1997). Ce modèle repose sur l'hypothèse selon laquelle les interactions latérales entre dimères de tubuline sont faibles. De plus, si les associations latérales de dimères se forment trop lentement, le GTP des oligomères sera hydrolysé en GDP avant qu'un feuillet de tubuline suffisamment grand ne se forme. Cet effet cinétique expliquerait l'hydrolyse de GTP lié aux processus de nucléation avortés. Les oligomères que nous avons stabilisés sont formés par associations latérales de dimères : ils pourraient donc « forcer » les interactions latérales entre protofilaments et faciliter la formation de feuillets bidimensionnels.

Nos résultats suggèrent que l'assemblage débute par la formation d'agrégats mesurant environ 100 nm mais de structure non déterminée. Les résultats obtenus en microscopie électronique indiquent que l'assemblage se poursuit avec la formation de feuillets de tubuline, qui sont progressivement remplacés par des microtubules. Ces résultats préliminaires sont en accord avec d'autres études qui montrent que la nucléation spontanée des microtubules passe par de petits feuillets de tubuline (Erickson, 1974). On retrouve le mécanisme de formation des microtubules décrit par Chrétien *et al.*, 1995 pour l'élongation : formation de feuillets qui se referment ensuite en microtubules.

Les oligomères sont constitués par l'association latérale de 8 à 10 dimères et il semble que les interactions latérales entre dimères soient difficiles à réaliser. On peut donc supposer que deux oligomères auront plus de facilité à interagir longitudinalement que latéralement. Cette interaction est d'autant plus facile qu'il y aura coopérativité entre les interactions des différents dimères constituant les oligomères. Si quatre des oligomères interagissent de la sorte, il se forme un assemblage en feuillet qui contient les amorces d'au moins 10 protofilaments. De plus, de la tubuline-GTP est nécessaire à cette étape : des dimères de tubuline-GTP sont probablement incorporés dans l'assemblage d'oligomères. Ce feuillet en se refermant pourrait alors former une amorce de microtubules. C'est peut-être l'apparition de ces feuillets qui est observé en diffusion de lumière.

Ce mécanisme pourrait-il avoir lieu *in vivo* ? Dans les cellules, le centrosome est le site majeur de la nucléation des microtubules. Plus précisément, la nucléation est catalysée par des assemblages multi-protéiques : les γ -TURC. Ces γ -TURC sont constitués par l'assemblage linéaire de tubuline γ et d'autres protéines (Moritz *et al.*, 2000; Moritz *et al.*, 1995). On pense que les γ -TURC servent d'amorce aux microtubules, mais le mécanisme précis reste controversé (Erickson, 2000). La question centrale est de savoir si les γ -TURC, qui se présentent sous la forme d'une amorce de spirale, interagissent latéralement ou longitudinalement avec les microtubules (Erickson, 2000; Keating et Borisy, 2000; Moritz *et al.*, 2000; Wiese et Zheng, 2000). En d'autres termes, on peut se demander si les sous-unités de tubuline γ formant les γ -TURC sont associées latéralement ou longitudinalement. S'il s'agit d'interactions latérales, le γ -TURC servirait d'amorce aux différents protofilaments. Dans ce cas, cela signifierait que les interactions latérales entre dimères sont limitantes dans la formation d'un microtubule. Au contraire, si les γ -TURC sont constitués de tubuline γ associées longitudinalement, cela signifierait que les interactions longitudinales sont limitantes dans la formation d'un microtubule. Les résultats les plus récents, fondés sur des immunomarquages et observations en microscopie électronique (Erickson, 2000; Keating et Borisy, 2000; Moritz *et al.*, 2000; Wiese et Zheng, 2000) penchent en faveur du modèle d'amorce des protofilaments. Dans ce cas, les γ -TURC catalyseraient la formation de feuillets de tubuline en favorisant les interactions latérales des dimères de tubuline. Ce mécanisme *in vivo* correspond à celui que nous décrivons *in vitro*. Il est donc envisageable que le mécanisme que nous décrivons ait une signification *in vivo*, la cellule ayant exploité le mécanisme de nucléation spontanée des microtubules.

Enfin, nous montrons que dans des conditions où il n'y a pas de nucléation spontanée des microtubules, les microtubules ne désassemblent pas spontanément non plus. Toutefois, les microtubules formés ne sont pas figés artificiellement, à cause d'une structure anormale par exemple. Ces microtubules formés sur amorces peuvent en effet être désassemblés au froid, et sont dynamiques à l'état stationnaire. Les microtubules ne désassemblent pas spontanément sans doute parce qu'il manque les facteurs de catastrophe évoqués au chapitre

III. Sans doute ces facteurs de catastrophe ne se forment-ils pas en dessous de la concentration critique : il serait intéressant de comparer les propriétés de désassemblage des microtubules assemblés en absence de GTP en excès en dessous de la concentration critique et nucléés à partir de fragments de microtubules ou à partir d'axonèmes. Les microtubules formés dans ces conditions ne devraient pas désassembler spontanément non plus. Les microtubules se trouvent donc dans un état stable en l'absence de consommation d'énergie. Les microtubules se trouvent sans doute dans l'état métastable décrit par Tran *et al.*, 1997. Les conditions d'assemblage en dessous de la concentration critique, en absence de GTP libre et en présence d'oligomères stimulant la nucléation sont donc adaptées à la recherche de ces facteurs de catastrophes. On peut en effet envisager de purifier différentes catégories d'oligomères de tubuline et de tester leur activité de facteur de catastrophe. D'autres effecteurs tels que des protéines stimulant les catastrophes pourraient également être étudiés dans ces conditions.

Par ailleurs, nous retrouvons le lien entre oligomères de nucléation et facteurs de catastrophes suggéré précédemment (chapitre III). Dans des conditions où la nucléation n'a pas lieu spontanément, le désassemblage n'a pas lieu non plus. Cependant, les oligomères de nucléation que nous avons produits ne semblent pas capables de déclencher le désassemblage. Les facteurs de catastrophes représentent donc sans doute une autre catégorie d'oligomères de tubuline. Ces résultats montrent que les conditions de formation des oligomères de nucléation et des facteurs de catastrophes sont comparables. Il s'agit d'une piste pour tenter de stabiliser et purifier les facteurs de catastrophe.

Chapitre V : Recherche de partenaires de la tubuline

V Identification de partenaires de la tubuline

De nombreux effecteurs du cytosquelette microtubulaire sont actuellement connus. La plupart agissent en se liant aux microtubules (pour une revue voir Hirokawa, 1994), et seuls quelques uns agissent en se liant aux dimères de tubuline libres (pour une revue, voir Walczak, 2000). La concentration en tubuline libre influence très fortement toute la réaction d'assemblage et désassemblage des microtubules (*e. g.* Carlier *et al.*, 1987a; Caudron *et al.*, 2000; Flyvbjerg *et al.*, 1996a; Flyvbjerg *et al.*, 1996b; Johnson et Borisy, 1977). En faisant varier la concentration de tubuline disponible, des protéines interagissant avec la tubuline dimérique sont des effecteurs potentiels du cytosquelette microtubulaire. Nous avons développé une stratégie de recherche et d'identification systématique de partenaires de la tubuline.

Plusieurs types de stratégies ont été développées pour rechercher des effecteurs du cytosquelette microtubulaire. Les premières MAPs ont par exemple été identifiées grâce à leur capacité à lier les microtubules. Ainsi, les MAPs peuvent être purifiées par des expériences de « recyclage ». De la tubuline est assemblée en microtubules dans des extraits cellulaires, puis les microtubules sont sédimentés par centrifugation. Le culot de microtubule contient de la tubuline et des MAPs. En faisant varier la nature des extraits, les conditions d'assemblage, on obtient des fractions enrichies en différentes MAPs. La protéine STOP a été purifiée à partir d'extraits de cerveau comme la protéine associée aux microtubules qui ne désassemblent pas lors d'une exposition au froid (pour une revue, voir Bosc *et al.*, 1999).

D'autres stratégies utilisent des tests d'assemblage *in vitro* avec de la tubuline purifiée ou dans des extraits d'œufs de Xénope. Différentes fractions d'extraits tissulaires ou cellulaires sont ajoutées et leur effet est mesuré. Ces tests permettent de suivre une activité lors d'étapes de fractionnement. Le polypeptide MINUS (Fanara *et al.*, 1999), la stathmine (Belmont et Mitchison, 1996) ou encore des drogues anti-microtubulaires (*e. g.* Lopes *et al.*, 1997) ont été identifiées ainsi. L'existence de tests semi-automatisés permet d'accélérer et de systématiser ces recherches (Lopes *et al.*, 1997).

Des effecteurs du cytosquelette microtubulaire ont également été identifiées par les techniques de biologie moléculaire. Ainsi, la technique de double hybride, en utilisant la tubuline comme hameçon a permis d'identifier la protéine EB1 comme partenaire de la tubuline (Schwartz *et al.*, 1997). Des études de génétique classique (interactions génétiques par exemple) sur des modèles comme la drosophile ou les levures ont permis de découvrir d'autres protéines interagissant avec le cytosquelette microtubulaire, comme des cofacteurs nécessaires au repliement et à l'assemblage du dimère de tubuline (Fleming *et al.*, 2000).

Enfin, quelques stratégies de biochimie ont été utilisées : des colonnes d'affinité ont ainsi été préparées en greffant la tubuline ou des peptides de la tubuline sur une matrice et en

déposant divers extraits sur la colonne (*e. g.* Gonzalez *et al.*, 1995). Toutefois, cette technique s'est heurtée à un inconvénient majeur : la tubuline est irréversiblement dénaturée lors du couplage à la matrice. De plus, l'élution de ces colonnes est en général réalisée en augmentant la force ionique ou en faisant varier le pH. Les protéines sont donc soit dénaturées soit dans un tampon qui n'est pas propice à des tests fonctionnels. Nous avons donc choisi une technique de chromatographie d'affinité qui surmonte ces difficultés.

V.1 Principe de la technique

La colonne utilisée est composée d'une matrice de Sépharose 4B sur laquelle est greffé un anticorps monoclonal dirigé contre l'extrémité carboxyterminale de la tubuline α (clone YL1/2, Wehland *et al.*, 1983). L'extrémité carboxyterminale de la tubuline α est la cible d'une série de modifications posttraductionnelles : l'élimination d'un ou deux acides aminés (voir chapitre I ou Lafanechère et Job, 2000). La séquence de l'extrémité carboxyterminale de la tubuline α de mammifère se termine par Glu-Glu-Tyr. La tyrosine peut être éliminée conduisant à la formation de tubuline dite tubuline-glu, puis dans un second temps le glutamate précédent peut également être enlevé et la tubuline est appelée tubuline- $\Delta 2$ (Paturle-Lafanechère *et al.*, 1991; Paturle-Lafanechère *et al.*, 1994). Les enzymes impliquées dans ces étapes ne sont pas connues. Si seule la tyrosine a été enlevée, une enzyme est capable d'ajouter à nouveau une tyrosine en reformant la liaison peptidique. Cette enzyme a été purifiée et clonée et est baptisée tubuline tyrosine ligase (TTL, Ersfeld *et al.*, 1993; Wehland *et al.*, 1986). Chez la levure *S. cerevisiae*, la séquence carboxyterminale de la tubuline α est légèrement différente, puisque le dernier acide aminé est une phénylalanine, un acide aminé aromatique très proche de la tyrosine. Les réactions de déphénylalanination-phénylalanination équivalentes à la tyrosination-détyrosination existent également chez cet organisme. L'anticorps YL1/2 a été produit contre la tubuline de levure. Il reconnaît la tubuline portant la phénylalanine carboxyterminale, mais pas la tubuline déphénylalaninée. Un peptide comportant les 12 derniers acides aminés de la tubuline α est un compétiteur de la tubuline α entière vis à vis de l'anticorps. De la même façon, l'anticorps YL1/2 discrimine entre la tubuline α de mammifère tyrosinée et détyrosinée, sur l'épitope équivalent (Wehland *et al.*, 1983).

Le principe de la chromatographie a donc été de coupler l'anticorps YL1/2 à la matrice de Sépharose 4B. Puis de la tubuline purifiée à partir de cerveau de bœuf était déposée sur la colonne, où elle était retenue par l'anticorps : la tubuline est native dans la colonne. Cette colonne était alors utilisée comme colonne d'affinité et des extraits tissulaires et cellulaires étaient déposés. Les partenaires interagissant avec la tubuline étaient retenus, alors que des lavages extensifs éliminaient les autres protéines. L'élution des complexes formés par la tubuline et ses partenaires étaient alors réalisée en ajoutant des solutions du peptide reconnu par l'anticorps YL1/2 : par compétition, la tubuline était libérée. L'élution par compétition

avec le peptide a plusieurs avantages par rapport aux éluions par augmentation de la force ionique ou variation du pH. Tout d'abord, la tubuline est éluee dans un tampon non dénaturant et dans lequel elle peut être assemblée en microtubules. Ensuite, les complexes tubuline-partenaire ne sont pas dissociés et peuvent donc être étudiés à l'état natif. Enfin, l'utilisation d'un peptide compétiteur garantit que les protéines éluees étaient liées à l'anticorps : la spécificité de la colonne est renforcée.

La tubuline purifiée à partir de cerveau de bœuf contient 35% de tubuline- $\Delta 2$, 40% de tubuline-glu et 13% de tubuline tyrosinée (Paturle-Lafanechère *et al.*, 1994). La proportion de tubuline tyrosinée peut être augmentée en réalisant une tyrosination *in vitro* de la tubuline purifiée à partir de cerveau de bœuf. Dans les conditions de tyrosination utilisées, on obtient 50% de tubuline tyrosinée au maximum. En effet, la tubuline- $\Delta 2$ ne peut pas être tyrosinée.

Les complexes élues peuvent ensuite être caractérisés. Pour cela, les solutions de protéines ont été analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes. Puis les bandes correspondant à des protéines suffisamment abondantes ont été analysées en spectrométrie de masse pour réaliser une carte de masses peptidiques. La comparaison avec les banques de données de séquences a permis d'identifier certaines de ces protéines. Par ailleurs, des tests fonctionnels peuvent être envisagés. Notamment, les solutions de protéines éluees des colonnes peuvent être soumises à une réaction d'assemblage de la tubuline en microtubules. Par comparaison avec de la tubuline pure, les activités contrôlant la réaction d'assemblage de la tubuline peuvent ainsi être détectées. Toutes sortes de tests peuvent être imaginés, comme la phosphorylation *in vitro* des protéines éluees par diverses protéines kinases. Cette technique chromatographique permet donc de caractériser les partenaires de la tubuline dimérique avec des approches complémentaires. De plus, avec les programmes de séquençage systématique des génomes, il est possible d'identifier les protéines par spectrométrie de masse puis d'exploiter directement les clones codant ces protéines. La fonction des protéines identifiées peut donc être explorée avec toutes les méthodes de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire, ainsi que par les techniques de biochimie en utilisant des protéines recombinantes produites en masse.

V.2 Résultats

La réaction de tyrosination a été réalisée comme décrit précédemment (Paturle *et al.*, 1989), mais en utilisant de la TTL produite dans des cellules d'insectes par un Baculovirus recombinant. Les cellules d'insectes ayant produit la TTL ont été collectées et stockées sous forme de culot de cellules par le Dr J. Wehland. Puis la TTL a été purifiée par chromatographie d'affinité par le Dr L. Lafanechère au laboratoire. L'activité de la TTL a été dosée *in vitro* comme décrit précédemment (Wehland *et al.*, 1986).

L'anticorps YL1/2 a été couplé à la matrice de Sépharose 4B par la méthode au bromure de cyanogène (Cuatrecasas, 1970). Des colonnes de 300 μ L ont été préparées et

équilibrées dans du tampon PEM. Puis de la PC-tubuline tyrosinée *in vitro* était déposée : environ 4 mg de tubuline totale soit 2 mg de tubuline tyrosinée, par mL de colonne. Après lavage, les extraits cellulaires ou tissulaires étaient déposés, puis des lavages extensifs éliminaient les protéines non liées. Afin d'augmenter le rendement de la colonne, les extraits étaient déposés sur la colonne par fractions égales à un demi volume de colonne et laissés en contact pendant 3 minutes. Enfin, les protéines retenues par l'anticorps étaient éluées par 5 volumes de colonne d'une solution de peptide compétiteur à la concentration de 100 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ dans du PEM.

V.2.1 Profil d'élué de la colonne

La figure V-1 présente un exemple de profil d'élué d'une colonne de 300 μL sur laquelle ont été déposés 300 μL de PC-tubuline tyrosinée à la concentration de 5 $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$, puis 1,5 mL d'extraits totaux de cerveau de rat (environ 100 $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$, chapitre II). La quantité de protéine en sortie de colonne a été déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm (figure V-1a), et des fractions aliquotes ont été prélevées et analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes (figure V-1b). La tubuline déposée n'est pas entièrement liée : on en retrouve dans le filtrat et les lavages par le PEM/NaCl 0,1 M. La tubuline qui n'est pas retenue représente tout d'abord la tubuline non tyrosinée lors de la préparation de la tubuline tyrosinée au maximum : la tubuline- $\Delta 2$ qui n'est pas tyrosinable (35% de la tubuline totale) et la tubuline-glu qui n'a pas été tyrosinée (5% de la tubuline totale, résultats non présentés). De plus, de la tubuline-tyr est retrouvée dans les solutions en sortie de colonne (analyse en *western-blot*, résultats V. Gache). La colonne est donc saturée en tubuline-tyr dans ces conditions. Lors du dépôt des extraits de cerveau de rat, beaucoup de protéines ne sont pas retenues sur la colonne et sont retrouvées dans le filtrat. Toutefois, après lavage par 40 volumes de colonne par le PEM, plus aucune protéine n'est détectée en sortie de colonne (figure V-1b). Enfin, lors de l'élué par la solution de peptide, l'essentiel des protéines sort dans les trois premiers volumes de colonne. On constate que la tubuline est la protéine majoritaire dans l'élué, mais qu'un nombre limité d'autres protéines est également visible. La colonne retient donc des protéines qui sont éluées par le peptide compétiteur. Nous n'avons pas recherché les conditions de saturation de la colonne par les extraits de cerveau. Toutefois, en déposant deux fois plus d'extraits, on n'observe pas en gel d'électrophorèse d'augmentation de la quantité de protéines éluées par le peptide (résultat non présenté). Nous avons vérifié que les protéines autres que la tubuline retenues sur la colonne sont des partenaires de la tubuline. En effet, certaines protéines des extraits pourraient être retenues par l'anticorps directement, sans être des partenaires de la tubuline. De telles protéines devraient donc être reconnues par l'anticorps YL1/2. Les fractions éluées par la solution de peptide ont donc été analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes et électrotransfert puis immunodétection avec l'anticorps YL1/2. L'anticorps YL1/2 reconnaît une seule bande

correspondant à la tubuline α (résultats V. Gache). Les protéines éluées sont donc des partenaires de la tubuline.

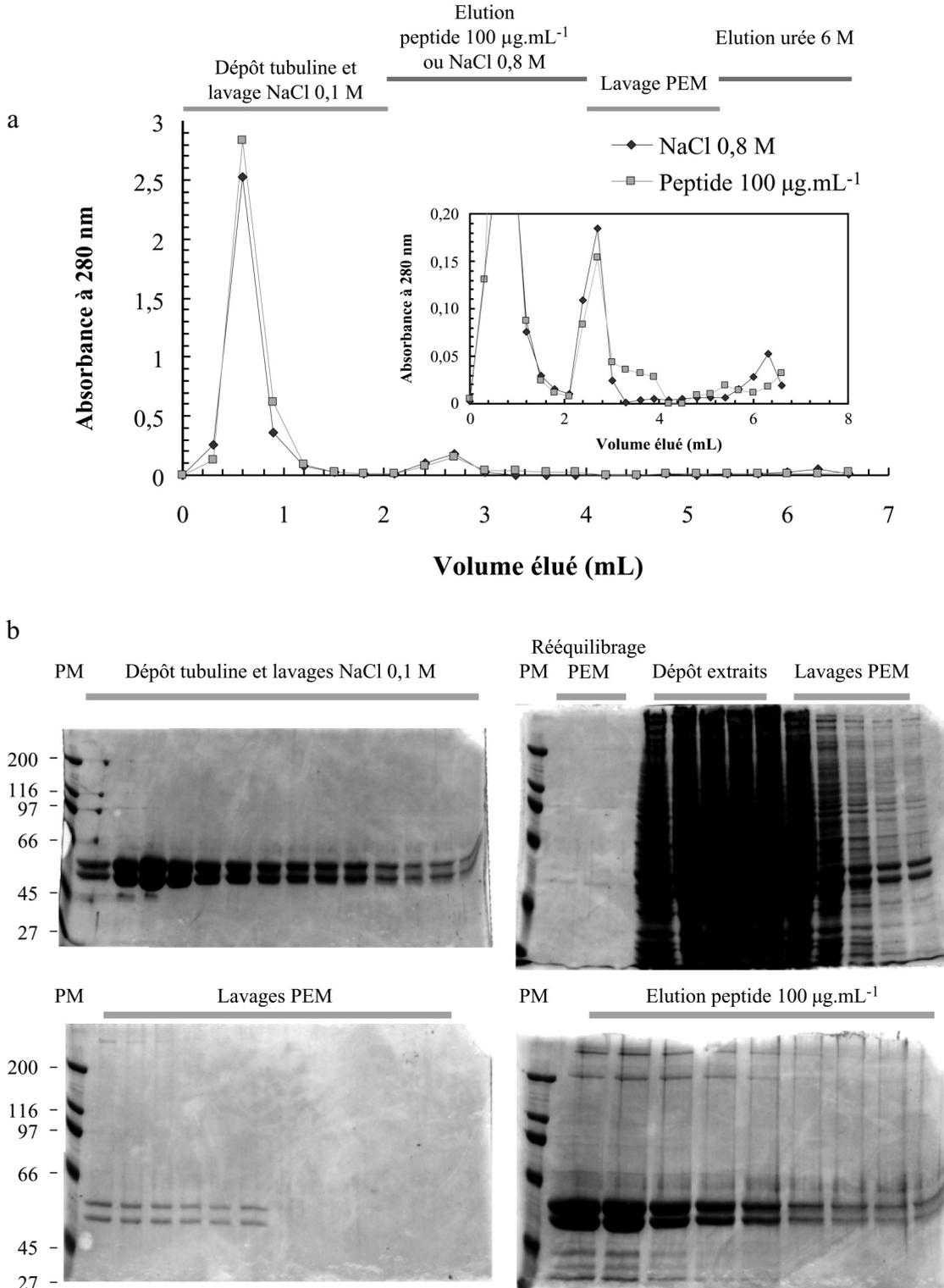


Figure V-1 : Profil d'élution de la colonne de chromatographie d'affinité. Une colonne d'affinité de $300 \mu\text{L}$ a été préparée et 4 mg.mL^{-1} de tubuline tyrosinée au maximum ont été déposés. (a) Quantité de protéine au cours de la chromatographie évaluée à partir de l'absorbance à 280 nm. L'élution a été réalisée avec une solution de peptide ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$

dans du PEM, carrés) ou une solution de NaCl (0,8 M dans du PEM, diamants) après dépôt de tubuline tyrosinée. Dans ce cas, aucun extrait n'a été déposé. L'abscisse 0 correspond au dépôt de la tubuline. La colonne a été lavée par 10 volumes de PEM/NaCl 0,1 M puis 5 volumes de PEM. L'élution a été réalisée par 10 volumes de la solution indiquée. En encart, l'échelle des ordonnées a été dilatée pour mettre en évidence le pic d'élution. (b) Analyse par électrophorèse en conditions dénaturantes des fractions éluées de la colonne (gels à 7,5% de polyacrylamide, coloration au bleu de Coomassie). La première piste de chaque gel a été chargée avec des marqueurs de poids moléculaire (PM, indiqué en kDa).

La colonne de chromatographie permet donc de purifier des complexes entre la tubuline et des partenaires de la tubuline. Les partenaires obtenus sont apparemment en nombre limité. Nous avons ensuite examiné les partenaires de la tubuline présents dans une gamme d'extraits tissulaires et cellulaires variés.

V.2.2 Dépôt de différents types d'extraits

Différents types d'extraits cellulaires et tissulaires ont été analysées par cette procédure, et les fractions de protéines interagissant avec la tubuline éluées par la solution de peptide compétiteur ont été analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes.

V.2.2.1 Extraits de cerveau de rat

V.2.2.1.1 Extraits totaux

Des cerveaux de rats ont été disséqués et homogénéisés au Potter. Puis les débris solides sont éliminés par centrifugation à 100000 g. Le surnageant est appelé extrait total et contient l'ensemble des protéines solubles du cytoplasme.

V.2.2.1.2 Extraits GDP et GTP

Le GDP et le GTP jouent un rôle essentiel dans l'assemblage des microtubules. Il est possible que certains partenaires de la tubuline soit capables de discriminer entre la tubuline-GDP et la tubuline-GTP, et éventuellement contrôlent l'échange GTD / GTP. Nous avons donc cherché des conditions où toute la tubuline serait entièrement liée à du GDP ou entièrement liée à du GTP.

Pour rechercher des partenaires de la tubuline-GDP, nous avons tout d'abord produit de la tubuline tyrosinée. Puis cette tubuline tyrosinée a été assemblée en microtubules. Les microtubules, constitués de tubuline-GDP, ont été sédimentés par centrifugation et exposés au froid pour qu'ils désassemblent. Les dimères de tubuline ont été repris dans une solution contenant du GDP 1 mM, et déposés sur la colonne de chromatographie. Puis tous les tampons utilisés pour la suite de la chromatographie étaient additionnés de GDP 1 mM. De plus, les extraits totaux de cerveau de rat ont été produits en homogénéisant les cerveaux dans

un tampon contenant du GDP 1 mM. Ainsi, toutes les solutions utilisées pour la chromatographies contenaient un excès de GDP par rapport à la tubuline présente. Une procédure similaire a été utilisée pour réaliser la chromatographie en présence d'un excès de GTP. La tubuline tyrosinée a été incubée en présence de GTP 1 mM. L'excès de nucléotide a été éliminé par filtration sur Biogel P30, et du GTP 1 mM a été ajouté à la solution de tubuline. Les extraits totaux de cerveau de rat ont été produits en présence de GTP 1 mM, et tous les tampons utilisés pour la chromatographie ont été additionnés de GTP 1 mM.

V.2.2.1.3 Extraits appauvris en microtubules et MAPs

Les MAPs sont caractérisées par leur capacité à lier les microtubules. Toutefois, certaines sont également capables de lier, au moins *in vitro*, la tubuline dimérique (chapitre I). Ces protéines sont donc en compétition avec les partenaires de la tubuline dimérique. Un protocole a été utilisé afin d'appauvrir les extraits de cerveau de rat en protéines liant les microtubules. Les protéines liant la tubuline dimérique mais pas les microtubules devraient alors être enrichies de manière relative. Le protocole est celui utilisé lors de la purification du polypeptide MINUS, qui inhibe la nucléation des microtubules (Fanara *et al.*, 1999). Les extraits totaux de cerveau de rat sont additionnés de GTP 1 mM et de Paclitaxel 20 μ M et de $MgCl_2$ 5 mM. Les extraits sont alors incubés à 35°C provoquant l'assemblage de la tubuline en microtubules. Les microtubules, ainsi que les MAPs, sont ensuite sédimentés par centrifugation à 100000 g. Le surnageant est donc appauvri en tubuline et en MAPs, et corrélativement enrichi en protéines liant uniquement la tubuline libre.

V.2.2.2 Extraits de cellules humaines

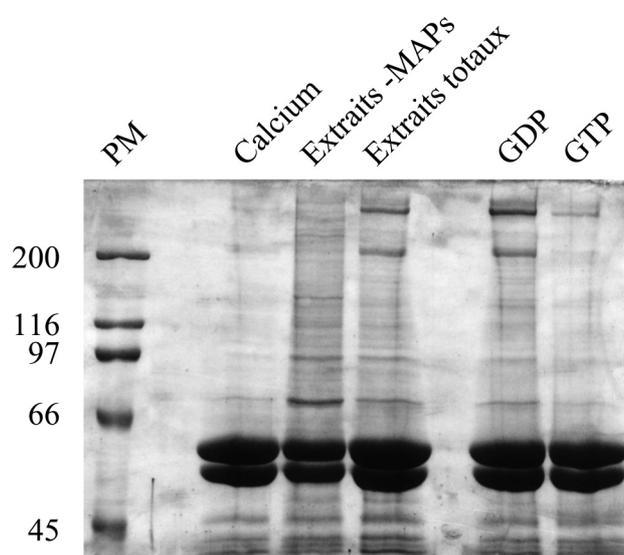
Des extraits de cellules HeLa cultivées en suspension ont été réalisés. Les cellules sont collectées par centrifugation et soumises à une lyse dans un tampon contenant un détergent, le Triton X100. Les débris cellulaires sont ensuite éliminés par ultracentrifugation à 100000 g. L'exploitation de ce type d'extraits est en cours au laboratoire.

V.2.3 Profil électrophorétique des solutions de complexes tubuline-partenaires

Tous ces extraits ont été soumis à la chromatographie d'affinité, et les fractions éluées par la solution de peptide ont été analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes. Les résultats sont présentés dans la figure V-2.

Dans tous les cas, la tubuline est la protéine majoritaire, et on compte sur les gels environ 30-40 bandes protéiques supplémentaires, pour des tailles allant de 20 à 400 kDa environ. Si l'on exclue les extraits appauvris en MAPs, les profils électrophorétiques sont comparables pour tous les types d'extraits. En revanche, dans les extraits appauvris en MAPs, on constate que deux bandes à 210 et 350 kDa environ sont absentes ici, alors qu'elles sont

présentes dans les extraits totaux. Ces deux protéines sont donc probablement des MAPs. Corrélativement à la disparition de ces deux protéines dans l'éluat, d'autres bandes invisibles dans les éluats des colonnes avec les extraits totaux apparaissent (à 70 et 90 kDa, et aux environs de 100 à 150 kDa). Ces protéines sont donc probablement des protéines interagissant avec la tubuline libre préférentiellement aux microtubules. Pour ce qui concerne les extraits GDP et GTP, peu de différences sont visibles, hormis une diminution de l'intensité des deux MAPs surtout à 210 et aussi à 350 kDa, alors que les protéines de poids moléculaire inférieur à la tubuline semblent être aussi abondantes dans les deux types d'extraits. Ces résultats suggèrent qu'il n'existe qu'un nombre limité de partenaires de la tubuline retenus par la colonne de chromatographie. De plus, des partenaires liant préférentiellement la tubuline libre peuvent être isolés.



Extraits de cerveau de rat

Figure V-2 : Analyse par électrophorèse en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide (7,5%) des fractions éluées de la colonne de chromatographie d'affinité par la solution de peptide, après dépôt de différents extraits tissulaires et cellulaires (voir texte). Dans la première piste ont été déposés des marqueurs de poids moléculaire dont le poids (en kDa) est indiqué à gauche du gel.

V.2.4 Identification des protéines éluées

V.2.4.1 Identification par électrotransfert et immunodétection

Des analyses par *western blot* ont été réalisées avec les anticorps disponibles au laboratoire pour les fractions éluées à partir d'extraits totaux de cerveau de rat (résultats non présentés). Un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine Tau révèle une série de bandes

de taille proche de 60-70 kDa. Ces tailles correspondent à la taille de la protéine Tau (**Dustin, 1984**), qui serait donc retenue sur la colonne. Un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine MAP2 reconnaît également une bande à 210 kDa, taille conforme aux données de la littérature. Enfin, un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine STOP reconnaît des bandes à 145 kDa et 70 kDa, qui correspondent aux tailles décrites pour les formes E (*early*) et N (*neuronal*) de la protéine STOP.

V.2.4.2 Identification par cartographie de masse peptidique

Différentes bandes observées après coloration au bleu de Coomassie sur les gels d'électrophorèse ont été découpées (figure V-3) et leur contenu soumis à analyse en spectrométrie de masse. Pour cela, les bandes de gel de polyacrylamide sont incubées avec de la trypsine, une protéase qui coupe la liaison peptidique située en carboxyterminal des acides aminés aromatiques. La masse des peptides protéolytiques est ensuite mesurée par spectrométrie de masse. La liste des peptides obtenus par digestion à la trypsine est comparée aux listes de peptides générés par une hydrolyse simulée des protéines connues dans les banques de données de séquence.

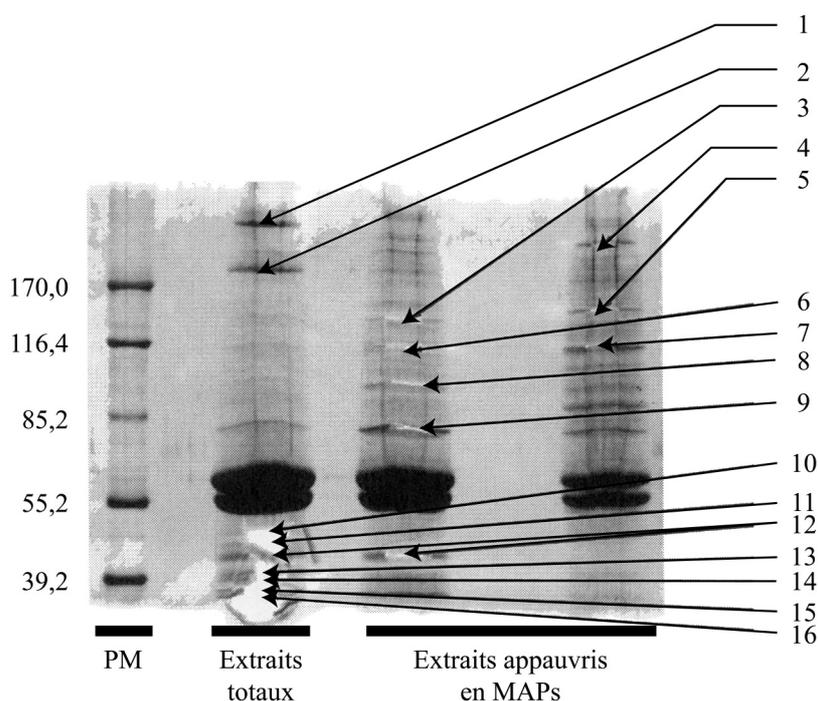


Figure V-3 : Bandes de protéines analysées par digestion à la trypsine et carte de masses peptidiques. Les numéros des bandes de protéines découpées correspondent aux numéros du tableau V-1 et du texte. Dans la première piste ont été déposés des marqueurs de poids moléculaire, dont la taille (en kDa) est indiquée à gauche du gel. La bande n°2 correspond à deux bandes très proches et d'égale intensité : celle de plus haut poids moléculaire est appelée n°2a et l'autre 2b.

Certaines bandes n'ont donné aucun résultat exploitable : soit il n'y avait pas assez de protéine, soit les échantillons étaient contaminés par des kératines humaines. C'est le cas des bandes n°1, 3, et 4 de la figure V-3. Pour les autres protéines, la liste des masses des peptides a été comparée avec celles des protéines présentes dans les banques de données de séquences. Pour les bandes n°7, 13, 14 et 15, aucune protéine des banques de données n'avait de liste de masses de peptides protéolytique identique à celle obtenue en spectrométrie de masse. Ces protéines sont donc actuellement absentes des banques de données. La comparaison avec les banques de données est répétée régulièrement, au fur et à mesure que de nouvelles séquences sont intégrées dans les banques.

D'autres bandes protéiques ont en revanche pu être identifiées sans équivoque. Ainsi, la bande n°8 correspond à la protéine Hsp90 : 8 peptides obtenus par spectrométrie de masse sont retrouvés dans la liste de masses des peptides de Hsp90. Ces peptides couvrent environ 42% de la protéine (figure V-4). De plus, la protéine identifiée comme Hsp90 correspond à une masse moléculaire apparente de 90 kDa environ. Les autres protéines qui ont pu être identifiées sont présentées dans le tableau V-1.

V.3 Discussion

V.3.1 Efficacité de la colonne

La colonne utilisée présente plusieurs avantages. Elle permet de rechercher des ligands de la tubuline native, ce qui n'est pas le cas de la plupart des études antérieures où seuls des peptides de la tubuline avaient été utilisés (Gonzalez *et al.*, 1995). Les protéines éluées se prêtent donc directement à une caractérisation fonctionnelle.

De plus, les études précédentes utilisaient des peptides de la tubuline exposés à la surface du microtubule (extrémités carboxyterminales des deux sous-unités), et visaient à identifier des protéines interagissant avec les microtubules et non pas avec la tubuline libre. Nous avons ici choisi de rechercher les partenaires interagissant préférentiellement avec la tubuline libre. Hormis la stathmine et la protéine SCG10 qui lui est apparentée (Lawler, 1998; Ozon *et al.*, 1997), peu d'effecteurs interférant avec la dynamique d'assemblage des microtubules ont été identifiés comme ligands de la tubuline libre (Walczak, 2000). Nous avons donc déposé sur la colonne des extraits tissulaires ou cellulaires appauvris en protéines associées aux microtubules. Ces extraits sont donc enrichis en protéines liant les dimères de tubuline libre. De plus, nous avons choisi un anticorps anti-tubuline dirigé contre l'extrémité carboxyterminale de la tubuline α . Cette région de la tubuline est exposée à la surface du microtubule et serait le site de liaison de nombreuses MAPs (Amos, 2000; Hirokawa, 1994; Nogales *et al.*, 1999). La liaison de l'anticorps à la tubuline masque donc cette région : les protéines liant la tubuline dans cette région ne sont donc probablement pas retenues sur la

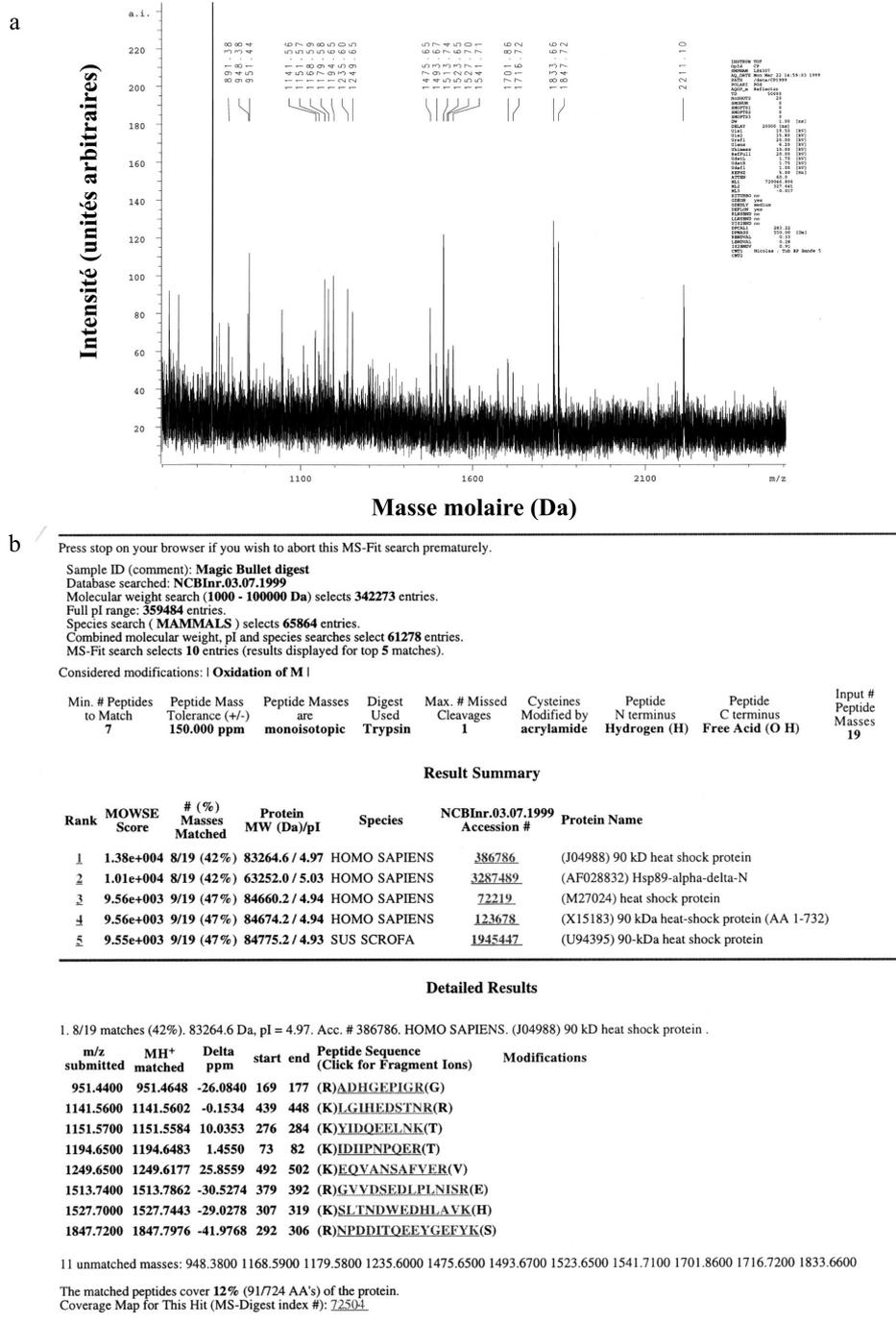


Figure V-4 : Identification de protéines séparées sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes par analyse des masses des fragments protéolytiques après digestion à la trypsine. (a) Spectre de masse des fragments générés par traitement à la trypsine de la bande n°8 de la figure V-3. En abscisse sont reportées les masses moléculaires (en Da) et en ordonnée l'intensité du pic (en unités arbitraires) qui est proportionnelle à l'abondance de chaque peptide. Au sommet de chaque pic est indiquée la masse moléculaire correspondante. (b) Résultats fournis par le logiciel Peptide Search de l'EMBL après soumission de la liste des masses obtenues en (a).

N° (Fig. V-3)	Masse moléculaire apparente (kDa – figure V-3)	Protéine ayant le meilleur score avec Peptide Search	Nombre de peptides identifiés / nombre de peptides en MALDI-TOF	% de la séquence de la protéine couverte	N° d'accès dans PubMed
1	>350	-	-	-	-
2a	Env. 200	MAP2 (202,4 kDa, MAP neuronale)	24/27	23%	91060576
2b	Env. 200	KIF21A (175,6 kDa, kinésine)	15/22	11%	7710046
3	140	-	-	-	-
4	290	-	-	-	-
5	140	-	-	-	-
6	115	-	-	-	-
7	115	Citrate-lyase (120,6 kDa, enzyme du métabolisme)	14/19	16%	113116
8	90	HSP90			
9	70	HSP70			
10	50	-	-	-	-
11	50	Tubuline β	6/8	13%	2661079
12	40	EB1 (37 kDa, protéine liant APC)	7/10	20%	97376852
13	Env. 40	-	-	-	-
14	Env. 40	-	-	-	-
15	Env. 40	-	-	-	-
16	30	EB2 (26 kDa, protéine liant APC)	11/16	47%	1256436

Tableau V-1 : Résultats de l'identification des protéines par cartographie peptidique.

colonne d'affinité. Les autres régions de la tubuline sont en revanche exposées, et notamment les surfaces sur lesquelles ont lieu les interactions entre dimères de tubuline lors de l'assemblage des microtubules. La procédure de chromatographie d'affinité permet donc de retenir les protéines liant préférentiellement le dimère, et en particulier au niveau de ces interfaces entre les dimères impliquées dans l'assemblage des microtubules. De telles protéines ont vraisemblablement un effet inhibiteur en empêchant l'interaction des dimères pour former des microtubules. La stratégie adoptée doit donc permettre d'isoler des protéines inhibant l'assemblage des microtubules en liant la tubuline libre. En parallèle, une stratégie

complémentaire a été développée au laboratoire afin de rechercher tous les partenaires de la tubuline. Pour cela, une procédure de chromatographie d'affinité avec un peptide de l'extrémité carboxyterminale de la tubuline α a été développée (travaux en cours).

La procédure utilisée a permis de mettre en évidence un nombre limité de partenaires de la tubuline dans les extraits tissulaires et cellulaires utilisés. La réalisation d'un « protéome microtubulaire » exhaustif est donc envisageable. Ce travail est en cours au laboratoire.

V.3.2 Protéines identifiées

Toutes les protéines qui ont pu être identifiées comme se liant à la tubuline sur la colonne d'affinité font sens : il s'agit soit de MAPs, soit de protéines déjà décrites comme se liant aux microtubules, soit interférant avec leur assemblage. Ce résultat valide la stratégie employée et permet de penser que les protéines encore inconnues et isolées ici sont des effecteurs du cytosquelette microtubulaire.

V.3.2.1 Les protéines associées aux microtubules

Les protéines Tau et MAP2 ont été directement identifiées par immunodétection. De plus, la protéine MAP2 a été identifiée par spectrométrie de masse comme étant la bande à 210 kDa de la figure V-4. Cette protéine de 210 kDa est d'ailleurs indécidable sur gel de polyacrylamide dans l'éluat des colonnes réalisées avec les extraits de cerveau appauvris en MAPs. Enfin, cette protéine de 210 kDa a un comportement identique à celui de MAP2 sur colonne de phosphocellulose P11 Whatman : elle est retenue dans le tampon PEM et du PEM/NaCl 0,4 M, mais est éluée par du PEM/NaCl 0,8 M (résultat non présenté, Dustin, 1984). La protéine MAP2 semble de plus légèrement enrichie dans l'éluat des chromatographies réalisées en excès de GDP : MAP2 se lierait donc préférentiellement à la tubuline-GDP. Ce résultat semble cohérent avec le fait que MAP2 se lie aux microtubules, qui sont constitués de tubuline-GDP.

La protéine KIF21A a également été identifiée comme une protéine de poids moléculaire apparent de 200 kDa (bande n°2a de la figure V-4). KIF21A est une nouvelle protéine de la famille des kinésines, qui définit une nouvelle sous-famille de kinésines. Cette protéine est enrichie dans les neurones, où elle se répartit dans toute la cellule. Sa fonction est encore inconnue (Marszalek *et al.*, 1999).

La protéine de 350 kDa (bande n°1) de la figure V-4 apparaît sous forme d'un doublet en gel d'électrophorèse après coloration au bleu de Coomassie. Cette protéine n'a pu être identifiée en spectrométrie de masse : pour des poids moléculaires si élevés, il faut beaucoup de protéine pour que sa concentration molaire atteigne le seuil de détection de la spectrométrie de masse. Cette protéine semble être une MAP, puisqu'elle disparaît dans les éluats des colonnes réalisées avec les extraits appauvris en MAPs. De plus, cette protéine de 350 kDa est retenue sur colonne de phosphocellulose dans du PEM, et est éluée par du

PEM/NaCl 0,4 M (résultat non présenté) : il s'agit donc d'une protéine chargée positivement au pH du PEM (6,65), donc basique. Il est donc très probable que cette protéine, qui est une protéine basique, se liant aux microtubules et apparaissant sous la forme d'un doublet d'environ 350 kDa soit la protéine MAP1 (Dustin, 1984).

Des expériences de pontage covalent des MAPs sur les microtubules, ont suggéré que les MAPs et les moteurs moléculaires interagissent avec la tubuline par les extrémité carboxyterminale de la tubuline α ou β (Walsh *et al.*, 1989). Toutefois, les domaines carboxyterminaux de la tubuline ne sont pas nécessaires à la liaison des MAPs à la tubuline. Ces domaines peuvent être éliminés sélectivement sur la tubuline α ou sur la tubuline β par protéolyse ménagée de microtubules par la subtilisine. Or les MAPs sont capables de se lier aux microtubules ainsi traités. De plus, les MAPs stabilisent ces microtubules et induisent la formation de faisceaux de microtubules, comme pour les microtubules non traités à la subtilisine (Saoudi *et al.*, 1995). La chromatographie utilisée ici masque l'extrémité carboxyterminale de la tubuline α , mais les MAPs sont capables de lier le tubuline. Nos résultats confirment donc que l'extrémité carboxyterminale de la tubuline α n'est pas nécessaire à la liaison des MAPs sur la tubuline.

V.3.2.2 Les protéines de la famille EB1

Parmi les protéines identifiées, on trouve les protéines EB1 et EB2 (bandes n°12 et 16 de la figure V-4). La famille EB1 est une famille de protéines hautement conservées au cours de l'évolution, connue chez les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe*, la drosophile, le nématode *C. elegans* et chez les mammifères. EB1 a tout d'abord été identifiée comme un partenaire d'un gène suppresseur de tumeur fréquemment muté dans les cancers du colon, la protéine APC (Kinzler et Vogelstein, 1996). Puis BIM1 l'homologue d'EB1 chez la levure *S. cerevisiae* a été identifié comme une protéine interagissant avec les microtubules. Plusieurs autres homologues ont ensuite été identifiés dans d'autres organismes grâce aux programmes de séquençage systématique des génomes, définissant une famille de protéines présentant de fortes homologies de séquence (pour une revue, voir Tirnauer et Bierer, 2000). BIM1 a été localisée par immunofluorescence chez la levure aux extrémités périphériques des microtubules ainsi qu'au pôle du fuseau mitotique (Tirnauer *et al.*, 1999). Chez les mammifères, EB1 a été localisée au centrosome, sur le fuseau mitotique et à l'extrémité périphérique des microtubules (Berrueta *et al.*, 1998). L'étude de mutants *bim1* chez la levure montre que BIM1 favorise la formation de microtubules longs et dynamiques, tels qu'il s'en forme pendant la phase G1. Or ces microtubules longs et dynamiques sont impliqués dans le positionnement correct du futur pôle du fuseau mitotique (Adames et Cooper, 2000). Toutefois, on ne sait pas si l'interaction d'EB1 avec les microtubules est directe ou passe par une autre protéine. Les résultats obtenus dans cette étude montre qu'EB1 peut lier de la tubuline dimérique dans une colonne d'affinité. Ces résultats n'excluent pas qu'il existe une

protéine intermédiaire liant EB1 à la tubuline, mais nous pourrions tester directement cette interaction. La protéine EB1 peut être produite en masse dans la bactérie et pourrait être déposée sur la colonne d'affinité.

Comment la protéine EB1 reconnaît-elle les extrémités des microtubules, et pourquoi ne se lie-t-elle pas sur toute la longueur de microtubules ? Il a été proposé que la protéine EB1 reconnaisse une conformation particulière des sous-unités de tubuline aux extrémités des microtubules (Tirnauer et Bierer, 2000). Cette conformation particulière pourrait être liée à la présence de feuillettes à l'extrémité des microtubules en cours d'élongation, ou au contraire aux protofilaments recourbés (en « peau de banane », voir chapitre 1), ou à la présence de la coiffe de GTP. Cette dernière hypothèse ne semble pas confirmée ici, puisque la protéine EB1 n'est pas enrichie dans les éluats des colonnes réalisées en présence d'un excès de GDP ou d'un excès de GTP. La protéine EB1 ne semble donc pas capable de distinguer la tubuline-GDP de la tubuline-GTP. Il serait donc intéressant de tester directement l'interaction de la protéine EB1 recombinante purifiée avec des feuillettes de tubuline (formés en présence de Zn^{2+}) ou avec des oligomères de tubuline.

V.3.2.3 Les HSPs

Des interactions entre les protéines de choc thermique (HSP) et les microtubules ont été montrées par de nombreuses études. Chez les eucaryotes, il existe plusieurs familles de HSP, correspondant à des familles de protéines de poids moléculaires différents, qui sont très conservées au cours de l'évolution. Les protéines de la famille de HSP90 sont des chaperonnes qui participent au maintien de l'activité d'un grand nombre de protéines. Parmi les cibles des HSP90, on trouve des protéines impliquées dans des voies de signalisation intracellulaire et du contrôle du cycle cellulaire, des récepteurs d'hormones stéroïdiennes, des protéines nécessaires à la réplication de l'ADN (Hartl, 1996). Ces protéines sont exprimées constitutivement et peuvent aussi être induites par un choc thermique ou par des signaux développementaux. HSP90 a été localisée avec les microtubules dans certaines cellules en interphase (Redmond *et al.*, 1989), mais ce résultat ne peut pas être généralisé à toutes les cellules. Chez la Drosophile, des mutants hétérozygotes *hsp82* présentent une stérilité mâle due à des défauts dans la spermatogenèse. Tous les stades de la spermatogenèse impliquant les microtubules sont affectés, et la mutation du gène homologue chez la levure est associée à la formation de microtubules anormaux (Yue *et al.*, 1999). De plus, la protéine HSP90 peut être sédimentée par centrifugation avec des microtubules assemblés en présence de taxol. Toutefois, elle ne reste pas associée aux microtubules au cours de cycles d'assemblage et désassemblage, ce qui suggère qu'elle n'a pas un effet direct sur la dynamique des microtubules (Yue *et al.*, 1999). Par ailleurs, HSP90 a été détectée au centrosome chez la drosophile et les vertébrés. De plus, l'inhibition par la geldanamycine de la protéine HSP90 provoque des anomalies dans la maturation et la séparation des centrosomes, ainsi que la

formation de fuseaux mitotiques anormaux. HSP90 serait donc impliqué dans le fonctionnement du centrosome, mais ce rôle ne serait pas lié aux microtubules (Lange *et al.*, 2000b).

Nous montrons ici que les protéines HSP90 sont retenues sur la colonne d'affinité et de plus elles sont enrichies dans les extraits appauvris en MAPs. Les HSP90 sont donc des protéines liant préférentiellement la tubuline libre, ce qui est compatible avec le fait qu'elles ne restent pas associées aux microtubules lors de cycles d'assemblage et désassemblage. En revanche, HSP90 en se liant à la tubuline libre pourrait interférer directement avec la dynamique d'assemblage des microtubules. Cet effet pourrait être testé directement *in vitro* avec HSP90 purifiée. Toutefois, la purification de cette protéine est difficile et il est difficile d'en obtenir en quantités suffisantes pour effectuer des tests *in vitro*. De tels tests ont été réalisés, mais avec une stœchiométrie d'une tubuline pour une HSP90. Dans ces conditions, HSP90 inhibe l'assemblage de la tubuline en microtubules (Garnier *et al.*, 1998).

Les protéines de la famille HSP70 ont un rôle dans la dynamique d'assemblage des microtubules qui est mieux documenté. Les protéines de la famille HSP70 sont des chaperonnes très conservées des bactéries aux mammifères, dont l'expression est induite par un choc thermique. Elles participent également à de nombreuses fonctions cellulaires, comme le repliement des protéines, la translocation des protéines à travers les membranes des organites, ou l'assemblage de protéines oligomériques (Hartl, 1996). Les HSP70 ont un rôle important dans la physiologie du cytosquelette et des microtubules en particulier : elles servent de chaperonnes aux tubulines, sont localisées aux centrosomes dans les cellules traitées au nocodazole (Liang et MacRae, 1997). Chez la levure *S. cerevisiae*, des mutants thermosensibles du gène *hsp70*, présentent des réseaux microtubulaires anormaux aux températures non permissives. De plus, HSP70 est associée aux microtubules des flagelles de l'algue *Chlamydomonas* (Bloch et Johnson, 1995). *In vitro*, la liaison des HSP70 aux microtubules a également été démontrée. Des expériences de coupure de l'extrémité carboxyterminale des tubulines α et β par la subtilisine suggèrent que la région carboxyterminale des tubulines serait impliquée dans cette liaison (Karasev *et al.*, 1992; Sanchez *et al.*, 1994). Toutefois, le rôle des HSP70 dans la physiologie du cytosquelette microtubulaire est mal comprise. De même que pour HSP90, HSP70 pourrait interférer directement avec la dynamique d'assemblage des microtubules. HSP70 est en effet une protéine liant préférentiellement le dimère, qui pourrait donc inhiber l'assemblage des microtubules. La production en masse de HSP70 recombinante est possible et sa purification permet d'obtenir des quantités importantes de HSP70. Le Dr M. Ladjimi (UMR 7631 CNRS Université Paris VI) nous a fourni des bactéries transformées par un vecteur d'expression du gène humain *HSC70*. La production, la purification et l'utilisation de HSC70 dans des tests *in vitro* sont en cours au laboratoire et permettront d'examiner cette question.

V.3.2.4 La citrate-lyase

La citrate-lyase est une enzyme cytosolique existant chez eucaryotes et les procaryotes. Elle catalyse la formation d'acétyl-coenzyme A et d'oxaloacétate à partir de citrate et de coenzyme A. Cette réaction nécessite l'hydrolyse d'une molécule d'ATP en ADP. La citrate-lyase est impliquée dans le métabolisme des acides gras, particulièrement dans les situations de jeûne (Voet et Voet, 1995). La liaison aux microtubules d'enzymes du métabolisme énergétique a déjà été décrite, en particulier pour les enzymes de la glycolyse (Walsh *et al.*, 1989). Toutefois, à l'exception de la pyruvate kinase (Vertessy *et al.*, 1999), aucune n'a été impliquée dans la dynamique d'assemblage des microtubules. La liaison de ces enzymes aux microtubules permet probablement d'organiser le métabolisme énergétique.

V.4 Conclusion

La procédure chromatographique développée dans cette étude permet d'isoler des partenaires de la tubuline interférant avec la dynamique d'assemblage de la tubuline. De plus, ces partenaires sont isolés à l'état natif et se prêtent donc à des tests fonctionnels. Les suites possibles de ce travail sont tout d'abord de compléter l'identification des protéines isolées par chromatographie. Ce travail est en cours. De plus, divers types d'extraits cellulaires peuvent être déposés sur la colonne : extraits de cellules synchronisées à différentes étapes du cycle cellulaire, extraits de différents tissus. Les profils électrophorétiques des éluats permettront de rechercher des effecteurs présents en quantités variables dans ces différents extraits. De plus, il sera possible de tester les propriétés d'assemblage en microtubules des complexes tubuline-partenaire, et de détecter des activités stimulant ou inhibant l'assemblage. Les techniques de biochimie pourront alors être exploitées pour purifier et caractériser ces activités. De plus, la possibilité d'identifier les protéines par spectrométrie de masse ouvre la possibilité d'accéder directement aux gènes déjà clonés de ces protéines.

D'autre part, des protéines encore inconnues sont détectées dans les éluats : la spectrométrie de masse pourra également apporter des informations. Si ces protéines sont suffisamment abondantes, il est possible d'obtenir des séquences d'acides aminés internes. Là encore, les techniques de biologie moléculaire pourront être mises en œuvre pour cloner puis caractériser ces nouvelles protéines.

Chapitre VI : Conclusion

VI Conclusion et perspectives

Le cytosquelette microtubulaire joue un rôle central dans l'organisation et la vie cellulaire. Son étude *in vitro* a mis en lumière des aspects inattendus tels que ses propriétés d'autoorganisation, le *treadmilling* ou l'instabilité dynamique. Ces propriétés des microtubules sont exploitées et contrôlées par les cellules. La compréhension de ces mécanismes est encore incomplète. Cette étude visait à déterminer les paramètres qui limitent la réaction d'assemblage et désassemblage des microtubules, et d'isoler des effecteurs contrôlant cette réaction.

Pour déterminer les facteurs limitant la réaction d'assemblage et désassemblage des microtubules, nous avons réalisé des études cinétiques. Nous avons choisi des conditions expérimentales simples : assemblage de tubuline-GTP en absence de GTP libre. Dans ces conditions, tous les paramètres de la réaction ont pu être mesurés avec précision : quantité de tubuline assemblée, quantité de tubuline-GTP et longueurs des microtubules. Nous avons donc suivi l'assemblage de tubuline-GTP en absence de GTP libre. La réaction présente alors une phase d'assemblage suivie par une phase de désassemblage.

Les études antérieures s'appuyant sur la loi d'action de masse, prédisaient que la formation de nouveaux microtubules était limitée au début de la réaction d'assemblage (Carlier et Pantaloni, 1978; Flyvbjerg *et al.*, 1996b; Johnson et Borisy, 1977; Kuchnir-Fygenson *et al.*, 1994; Kuchnir-Fygenson *et al.*, 1995; Voter et Erickson, 1984). La réaction consommant la tubuline-GTP, la vitesse de nucléation devait chuter rapidement. Au contraire, nous observons que la formation de nouveaux microtubules se poursuit à un taux constant pendant toute la phase d'assemblage, alors que la concentration en tubuline-GTP diminue fortement. Le taux de nucléation est donc indépendant vis à vis de la concentration en tubuline-GTP et ne peut s'expliquer par un modèle, où les microtubules se formeraient directement à partir de dimères de tubuline, selon la loi d'action de masse. Par ailleurs, nous observons que la vitesse de nucléation reste constante au cours de la phase d'assemblage et augmente fortement avec la concentration initiale en tubuline-GTP. Ce résultat pourrait s'expliquer par la formation rapide et irréversible d'un intermédiaire stable. Nous proposons que les intermédiaires de nucléation soient des oligomères de tubuline. Une faible proportion de ces oligomères participerait ensuite à la formation des microtubules. Nos résultats montrent qu'il faut environ 6 de ces oligomères pour former un nouveau microtubule. La nucléation des microtubules se produirait donc en deux étapes : formation rapide et irréversible d'oligomères de tubuline, puis assemblage de ces oligomères en microtubules.

Nous montrons également que la vitesse d'élongation des microtubules reste constante au cours de la réaction d'assemblage et qu'elle est indépendante de la concentration initiale en tubuline-GTP. Dans nos conditions expérimentales, loin de la concentration critique, la

vitesse d'élongation des microtubules n'est pas limitée par la quantité de tubuline-GTP disponible. Cette vitesse d'élongation est une propriété intrinsèque des microtubules, en accord avec d'autres études (Kuchnir-Fygenson *et al.*, 1994). La vitesse d'élongation refléterait sans doute un réarrangement de l'extrémité des microtubules, comme cela a été proposé (Chrétien *et al.*, 1995).

Enfin, nos résultats montrent que le désassemblage des microtubules se produit par catastrophes : les microtubules ne commencent pas tous à désassembler en même temps, et un microtubule qui commence à désassembler désassemble complètement. Ce mode de désassemblage est celui prédit par les modèles de l'instabilité dynamique (Mitchison et Kirschner, 1984) et décrit par les études en vidéomicroscopie (Horio et Hotani, 1986). La fréquence des catastrophes est indépendante de la concentration en tubuline-GTP présente lors du désassemblage. En revanche, le taux de catastrophe est fortement dépendant de la concentration initiale en tubuline-GTP. Nous proposons que cette dépendance vis-à-vis de la concentration initiale en tubuline-GTP soit due à des oligomères de tubuline. Ces oligomères stimulant le désassemblage se formeraient en quantité proportionnelle à la concentration initiale en tubuline-GTP.

Cette étude montre donc que les cinétiques d'assemblage et de désassemblage sont influencées par des facteurs très différents, comme le prédisent les modèles d'instabilité dynamique (Kirschner et Mitchison, 1986). D'autre part, ces résultats mettent en évidence l'importance des oligomères de tubuline dans le contrôle de la dynamique des microtubules. Les courbes d'assemblage et désassemblage sont très symétriques : cette symétrie suggère que les oligomères de tubuline contrôlant la nucléation et ceux contrôlant le désassemblage soient reliés. On peut proposer que ces deux catégories d'oligomères se forment dans des conditions voisines (concentration en tubuline-GTP notamment), ou encore que ce sont les mêmes oligomères qui contrôlèrent ces deux étapes.

Les conditions mises au point pour cette étude ont également permis de réexaminer le rôle du magnésium et de la tubuline-GDP, produit du désassemblage des microtubules. Nous observons que le magnésium augmente la vitesse de nucléation des microtubules et le taux de catastrophes mais ne modifie pas la vitesse d'élongation des microtubules. Le magnésium influence donc les deux étapes pour lesquelles nous proposons qu'elles soient contrôlées par des oligomères de tubuline. Ces résultats renforcent l'idée que les oligomères impliqués dans ces deux phases pourraient être reliés.

La tubuline-GDP n'influence pas non plus la vitesse d'élongation des microtubules. En revanche, elle inhibe la nucléation des microtubules, et ralentit fortement le désassemblage. Ainsi, la tubuline-GDP rend les courbes d'assemblage et désassemblage dissymétriques en ralentissant plus fortement le désassemblage que l'assemblage. Ainsi, les oligomères de tubuline contrôlant la nucléation d'une part et le désassemblage d'autre part

seraient sensibles à des facteurs différents et appartiendraient donc à deux catégories distinctes.

Dans une seconde partie, nous avons tenté d'isoler des oligomères de tubuline interférant avec la nucléation des microtubules. Nous avons mis au point un protocole de production d'amorces de nucléation des microtubules. Ces amorces sont produites par assemblage de microtubules qui sont pontés de façon modérée par de l'EGS, collectés par ultracentrifugation puis filtrés sur une membrane dont la taille des pores est de 100 nm. Les études en diffusion de lumière et en microscopie électronique à transmission montrent que les solutions ainsi préparées contiennent uniquement deux catégories de particules. On trouve d'une part de la tubuline dimérique et d'autre part des assemblages linéaires de tubuline d'environ 40 nm de longueur, mais pas de fragments de microtubules. L'étude des propriétés de liaison des nucléotides par ces oligomères de tubuline montrent que ces oligomères sont constitués d'un assemblage latéral de dimères de tubuline. Les cinétiques d'assemblage des microtubules en présence d'oligomères montrent qu'il faut environ quatre de ces oligomères pour former un nouveau microtubule.

La nucléation des microtubules à partir de tubuline pure *in vitro* aurait donc lieu en plusieurs étapes. Tout d'abord formation d'oligomères par assemblage latéral de dimères de tubuline. Puis un petit nombre de ces oligomères s'assembleraient sans doute pour former un feuillet qui se refermerait enfin en un microtubule.

Enfin, les conditions d'assemblage choisies, en absence de GTP libre et en présence d'oligomères de nucléation conduisent à la formation de microtubules qui ne désassemblent pas spontanément. Toutefois, ces microtubules sont capables d'être dynamiques en présence de GTP en excès. Ces conditions permettront donc de rechercher des activités de type « facteur de catastrophe ». Une stratégie de pontage covalent d'oligomères de tubuline produits dans diverses conditions permettra de produire différents oligomères. Par exemple, des oligomères de tubuline sont produits massivement lors des oscillations d'assemblage des microtubules (Pirollet *et al.*, 1987; Wade *et al.*, 1989). Ces oligomères pourraient être responsables des transitions synchrones des microtubules entre les phases d'assemblage et de désassemblage qui se succèdent lors des oscillations. Des traitements par des agents de pontage covalent permettront peut-être de stabiliser différents types d'oligomères. L'activité de facteur de catastrophe de ces différents oligomères pourra ensuite être testée sur les microtubules assemblés en présence d'oligomères de nucléation et en absence de GTP en excès.

Dans une dernière étape, nous avons développé une procédure chromatographique permettant d'isoler des protéines liant la tubuline à partir d'extraits tissulaires et cellulaires. La procédure chromatographique développée dans cette étude permet d'isoler des partenaires de la tubuline interférant avec la dynamique d'assemblage de la tubuline. De plus, ces partenaires sont isolés à l'état natif et se prêtent donc à des tests fonctionnels. L'identification

des protéines isolées par chromatographie sera poursuivie au laboratoire. De plus, divers types d'extraits cellulaires peuvent être déposés sur la colonne : extraits de cellules synchronisées à différentes étapes du cycle cellulaire, extraits de différents tissus. Les profils électrophorétiques des éluats permettront de rechercher des effecteurs présents en quantités variables dans ces différents extraits. Il sera également possible de tester les propriétés d'assemblage en microtubules des complexes tubuline-partenaire, et de détecter des activités stimulant ou inhibant l'assemblage. Les techniques de biochimie pourront alors être exploitées pour purifier et caractériser ces activités. La possibilité d'identifier les protéines par spectrométrie de masse permettra d'accéder directement aux gènes déjà clonés de ces protéines.

D'autre part, des protéines encore inconnues sont détectées dans les éluats : la spectrométrie de masse pourra également apporter des informations. Si ces protéines sont suffisamment abondantes, il est possible d'obtenir des séquences d'acides aminés internes. Là encore, les techniques de biologie moléculaire pourront être mises en œuvre pour cloner puis caractériser ces nouvelles protéines.

Annexes

Annexe 1 : composition des tampons

Tampons pour la tubuline

MEM

Mes	100 mM
EGTA	1 mM
MgCl ₂	1 mM

pH = 6,65 par NaOH

PEM

Pipes	100 mM
EGTA	1 mM
MgCl ₂	1 mM

pH = 6,65 par NaOH (PEM) ou par KOH (K-PEM)

Tampons pour la chromatographie par HPLC

Juste avant utilisation, ces deux tampons sont filtrés sur Büchner à travers une membrane dont les pores mesurent 0,2 µm, et sont dégazés à l'aide d'une trompe à vide.

Tampon A

KH ₂ PO ₄	50 mM
Tétrabutylammonium	0,1% v : v

pH = 6,0 par K₂HPO₄ 50 mM

Tampon B

Tampon A	40% v : v
Acétonitrile	60% v : v

Tampons pour l'électrophorèse des protéines en conditions dénaturantes

Tampon de dépôt

Tris-Cl	125 mM
SDS	2% v : v
Glycérol	10% v : v
2-mercaptoéthanol	10% v : v
Bleu de bromophénol	10% v : v

pH=6,8

Ce tampon est cinq fois concentré. Il est porté 5 minutes à 100°C, afin de dénaturer toute protéase contaminante.

Solution 1

Acrylamide	30% p : v
Bis-acrylamide	0,8% p : v

Solution 2

Tris-HCl	1,5 M
pH = 8,8	

Solution 3

SDS	10% v : v
-----	-----------

Solution 6

(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	10% p : v
pH = 6,8	

Glycérol 50%

Eau	50% v : v
Glycérol	50% v : v

Tampon de migration

Tris	50 mM
Glycine	384 mM
SDS	1% v : v
pH=8,6	

Tampons pour électrotransfert

Tampon de transfert

Tris	25 mM
Glycine	192 mM
Méthanol	20% v : v
pH=8,3	

Tampon pour les anticorps

Ces tampons sont utilisés soit pour les immunofluorescences indirectes (mesures de longueurs des microtubules), soit pour l'immunodétection de protéines par la technique de *Western*.

NaCl	136 mM
Na ₂ HPO ₄	8 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
KCl	2,7 mM
pH = 7,4	

Tampon pour la purification des immunoglobulines

Tampon acétate

Acétate de sodium	60 mM
pH = 4 par acide acétique dilué	

Tampons pour la production d'oligomères de tubuline**Solution A**

Pipes	160 mM
EGTA	2 mM
MgCl ₂	10 mM

pH = 6,65 par KOH

Solution B

Solution A	50% v : v
Glycérol	50% v : v

Solution D

Saccharose	500 g.L ⁻¹
Acide L-glutamique	10 mM

K-PEM

Annexe 2 : Dilution des anticorps

Anticorps primaires

Spécificité	Nom / Clone	Origine	Fournisseur	Utilisation	Dilution
Anti-MAP2	Clone AP20	Souris (monoclonal)	Boehringer Mannheim	<i>Western blot</i>	1/100000
Anti-Tau	Clone Tau-2	Souris (monoclonal)	Sigma Chemicals	<i>Western blot</i>	1/5000
Anti-Tubuline β		Souris (monoclonal)	Produit au laboratoire	Immuno- fluorescence indirecte	1/100000
Anti-E-MAP115	Clone D9C1	Souris (monoclonal)	Produit par D. Masson	<i>Western blot</i>	1/2000
Anti-STOP	23C	Lapin (polyclonal)	Produit au laboratoire	<i>Western blot</i>	1/5000

Anticorps secondaires

Spécificité	Nature	Origine	Fournisseur	Utilisation	Dilution
Anti-Ig de souris	IgG, couplée à la peroxydase de raifort	Chèvre	Cappel	<i>Western blot</i>	1/5000
Anti-Ig de souris	IgG, couplée à la cyanine III	Chèvre	Jackson	Immuno- fluorescence indirecte	1/1000
Anti-Ig de lapin	IgG, couplée à la peroxydase de raifort	Chèvre	Cappel	<i>Western blot</i>	1/5000

Annexe 3 : Saturation en sulfate d'ammonium

Concentration de départ	Concentration finale													
	10%	20%	25%	30%	35%	40%	45%	50%	55%	60%	65%	70%	75%	80%
0%	56	114	144	176	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561
10%	-	57	86	118	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494
20%		-	29	59	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424
25%			-	30	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390
30%				-	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356
35%					-	31	63	94	129	164	200	238	278	319
40%						-	31	63	97	132	168	205	245	285
45%							-	32	65	99	134	171	210	250
50%								-	33	66	101	137	176	214
55%									-	33	67	103	141	179
60%										-	34	69	105	143

Table de saturation en sulfate d'ammonium. Les valeurs sont données en nombre de grammes à ajouter par litre de solution pour changer la concentration de la concentration de départ à la concentration finale. Toutes les valeurs sont ajustées pour les changements de volume à température ambiante. La saturation en sulfate d'ammonium ne varie pas significativement entre 4°C et 25°C, si bien que les valeurs données ici peuvent être utilisées aux deux températures. La concentration de saturation en sulfate d'ammonium est de 4,1 M à 25°C soit 761 g.L⁻¹ (Sambrook *et al.*, 1989).

Annexe 4 : Article paru dans le *Journal of Molecular Biology*

Bibliographie

Bibliographie

1. Adames, N. R. et Cooper, J. A., 2000. Microtubule interactions with the cell cortex causing nuclear movements in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, 149: 863-874.
2. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. et Watson, J. D., 2000. Biologie Moléculaire de la Cellule. Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 1294 pp.
3. Alexandraki, D. et Ruderman, J. V., 1981. Sequence heterogeneity, multiplicity and genomic organization of α - and β -tubulin genes in sea urchin. *Mol. Cell. Biol.*, 1: 1125-1137.
4. Amos, L. A., 2000. Focusing-in on microtubules. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 10: 236-241.
5. Andersen, S. S. L., Buendia, B., Dominguez, J. E., Sawyer, A. et Karsenti, E., 1994. Effects on microtubule dynamics of XMAP230, a microtubule-associated protein present in *Xenopus laevis* eggs and dividing cells. *J. Cell Biol.*, 127: 1289-1299.
6. Andersen, S. S. L. et Karsenti, E., 1997. XMAP310: a *Xenopus* rescue-promoting factor localized to the mitotic spindle. *J. Cell Biol.*, 139: 975-983.
7. Azhar, S. et Murphy, D. B., 1990. Structural plugs at microtubule ends may regulate polymer dynamics in vitro. *Cell. Motil. Cytoskel.*, 15: 156-161.
8. Bayley, P. M. et Martin, S. R., 1986. Inhibition of microtubule elongation by GDP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 137: 351-358.
9. Bayley, P. M., Sharma, K. K. et Martin, S. R., 1994. Microtubule dynamics *in vitro*. In: J. Hyams and C.W. Lloyd (Editors), Microtubules. Modern Cell Biology. Wiley-Liss Inc., New York, pp. 111-137.
10. Belmont, L. D., Hyman, A. A., Sawin, K. E. et Mitchison, T. J., 1990. Real-time visualization of cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in cytoplasmic extracts. *Cell*, 62: 579-589.
11. Belmont, L. D. et Mitchison, T. J., 1996. Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules. *Cell*, 84: 623-631.
12. Berrueta, L., Kraeft, S.-K., Tirnauer, J. S., Schuyler, S. C., Bo Chen, L., Hill, D. E., Pellman, D. et Bierer, B. E., 1998. The adenomatous polyposis coli-binding protein EB1 is associated with cytoplasmic and spindle microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 10596-10601.
13. Binder, L. I., Frankfurter, A. et Rebhun, L. I., 1985. The distribution of Tau in the mammalian central nervous system. *J. Cell Biol.*, 101: 1371-1378.
14. Black, M. M. et Baas, P. W., 1989. The basis of polarity in neurons. *Trends Neurosci.*, 12: 211-214.
15. Bloch, M. A. et Johnson, K. A., 1995. Identification of a molecular chaperone in the eukaryotic flagellum and its localization to the site of microtubule assembly. *J. Cell Sci.*, 108: 3541-3545.
16. Bosc, C., Denarier, E., Andrieux, A. et Job, D., 1999. STOP proteins. *Cell Struct. Funct.*, 24: 393-399.
17. Brunner, D. et Nurse, P., 2000. CLIP170-like tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell*, 102: 695-704.
18. Burns, J. G. et Surridge, C. D., 1994. Tubulin: Conservation and structure. In: J. Hyams and C.W. Lloyd (Editors), Microtubules. Modern Cell Biology. Wiley-Liss Inc., New York, pp. 3-31.
19. Caplow, M., 1992. Microtubule dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 4: 58-65.
20. Caplow, M., Ruhlén, R., Shanks, J., Walker R.A. et Salmon, E. D., 1989. Stabilization of microtubules by tubulin-GDP-Pi subunits. *Biochemistry*, 28: 8136-8141.

21. Caplow, M., Ruhlen, R. L. et Shanks, J., 1994. The free energy for hydrolysis of a microtubule-bound nucleotide triphosphate is near zero : all of the free energy for hydrolysis is stored in the microtubule lattice. *J. Cell Biol.*, 127: 779-788.
22. Caplow, M. et Shanks, J., 1995. Induction of microtubule catastrophe by formation of Tubulin-GDP and apotubulin subunits at microtubule ends. *Biochemistry*, 34: 15732-15741.
23. Caplow, M. et Shanks, J., 1998. Microtubule dynamic instability does not result from stabilization of microtubules by tubulin-GDP-Pi subunits. *Biochemistry*, 37: 12994-13002.
24. Carlier, M.-F., 1991. Nucleotide hydrolysis in cytoskeletal assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 3: 12-17.
25. Carlier, M.-F., Didry, D. et Pantaloni, D., 1987a. MT elongation and guanosine 5'-triphosphate hydrolysis. Role of guanine nucleotides in MT dynamics. *Biochemistry*, 26: 4428-4437.
26. Carlier, M.-F., Didry, D. et Pantaloni, D., 1997. Hydrolysis of GTP associated with the formation of tubulin oligomers is involved in microtubule nucleation. *Biophys. J.*, 73: 418-427.
27. Carlier, M.-F., Melki, R., Pantaloni, D., Hill, T. L. et Chen, Y., 1987b. Synchronous oscillations in microtubule polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 5257-5261.
28. Carlier, M.-F. et Pantaloni, D., 1978. Kinetic analysis of cooperativity in tubulin polymerization in the presence of guanosine di- or tri-phosphate nucleotides. *Biochemistry*, 17: 1908-1915.
29. Caspi, M., Atlas, R., Kantor, A., Sapir, T. et Reiner, O., 2000. Interaction between Lis1 and doublecortin, two lissencephaly gene products. *Hum. Mol. Genet.*, 9: 2205-2213.
30. Cassimeris, L., Pryer, N. K. et Salmon, E. D., 1988. Real-time observations of microtubule dynamic instability in living cells. *J. Cell Biol.*, 107: 2223-2231.
31. Caudron, N., Valiron, O., Usson, Y., Valiron, P. et Job, D., 2000. A reassessment of the factors affecting microtubule assembly and disassembly in Vitro. *J. Mol. Biol.*, 297: 211-220.
32. Cavalier-Smith, T., 1987. The origin of eucaryote and archaebacterial cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 503: 17-54.
33. Charasse, S., Schroeder, M., Gauthier-Rouvière, C., Ango, F., Cassimeris, L., Gard, D. L. et Larroque, C., 1998. The TOGp protein is a new human microtubule associated protein homologous to the Xenopus XMAP215. *J. Cell Sci.*, 111: 1371-1383.
34. Chrétien, D., David Fuller, S. D. et Karsenti, E., 1995. Structure of growing microtubule ends : two-dimensional sheets close into tubes at variable rates. *J. Cell Biol.*, 129: 1311-1328.
35. Chrétien, D., Métoz, F., Verde, F., Karsenti, E. et Wade, R. H., 1992. Lattice defects in microtubules: protofilament numbers vary within individual microtubules. *J. Cell Biol.*, 117: 1031-1040.
36. Cleveland, D. W., 1989. Autoregulated control of tubulin synthesis in animal cells. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1: 10-14.
37. Cleveland, D. W. et Havercroft, J. C., 1983. Is apparent autoregulatory control of tubulin synthesis nontranscriptionally controlled ? *J. Cell Biol.*, 97: 919-924.
38. Correia, J. J., Baty, L. T. et Williams, R. C., 1987. Mg²⁺ dependence of guanine nucleotide binding to tubulin. *J. Biol. Chem.*, 262: 17278-17284.
39. Cuatrecasas, P., 1970. Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads. *J. Biol. Chem.*, 245: 3059-3065.
40. David-Pfeuty, T., Laporte, J. et Pantaloni, D., 1978. GTPase activity at ends of microtubules. *Nature*, 272: 282-284.
41. Denarier, E., Fourest-Lieuvain, A., Bosc, C., Pirollet, F., Chapel, A., Margolis, R. L. et Job, D., 1998. Non-neuronal isoforms of STOP protein are responsible for microtubule cold stability in mammalian fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 6055-6060.

42. Desai, A., Varma, S., Mitchison, T. J. et Walczak, C. E., 1999. KinI Kinesins are microtubule-destabilizing enzymes. *Cell*, 96: 69-78.
43. Drewes, G., Ebnet, A. et Mandelkow, E. M., 1998. MAPs, MARKs and microtubule dynamics. *Trends Biochem. Sci.*, 23: 307-311.
44. Dustin, P., 1984. Microtubules. Springer-Verlag, Heidelberg, 482 pp.
45. Dutcher, S. K., 2001. The tubulin fraternity: alpha to eta. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 13: 49-54.
46. Dye, R. B. et Williams, R. C., 1996. Assembly of microtubules from tubulin bearing the nonhydrolyzable guanosine triphosphate analogue GMPPCP [Guanilyl 5'-(β,γ -methylenediphosphonate)] : variability of growth rates and the hydrolysis of GTP. *Biochemistry*, 35: 14331-14339.
47. Erickson, H. P., 1974. Microtubule surface lattice and subunit structure and observations on tubulin reassembly. *J. Cell Biol.*, 60: 153-167.
48. Erickson, H. P., 1997. FtsZ, a tubulin homologue in prokaryote cell division. *Trends Cell Biol.*, 7: 362-367.
49. Erickson, H. P., 1998. Atomic structures of tubulin and FtsZ. *Trends Cell Biol.*, 8: 133-137.
50. Erickson, H. P., 2000. γ -tubulin nucleation: template or protofilament. *Nat. Cell Biol.*, 2: E93-E96.
51. Erickson, H. P. et Stoffler, D., 1996. Protofilaments and rings, two conformations of the tubulin family conserved from FtsZ to α/β and γ tubulin. *J. Cell Biol.*, 135: 5-8.
52. Erickson, H. P., Taylor, D. W., Taylor, K. A. et Bramhill, D., 1996. Bacterial cell division protein FtsZ assembles into protofilaments sheets and minirings, structural homologs of tubulin polymers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 519-523.
53. Ersfeld, K., Wehland, J., Plessmann, U., Dodemont, H., Gerke, V. et Weber, K., 1993. Characterization of the tubulin-tyrosin ligase. *J. Cell Biol.*, 120: 725-732.
54. Fanara, P., Oback, B., Ashman, K., Podtelejnikov, A. et Brandt, R., 1999. Identification of MINUS, a small polypeptide that functions as a microtubule nucleation suppressor. *EMBO J.*, 18: 565-577.
55. Fleming, J. A., Vega, L. R. et Solomon, F., 2000. Function of tubulin binding proteins *in vivo*. *Genetics*, 156: 69-80.
56. Flyvberg, H., Holy, T. E. et Leibler, S., 1994. Stochastic dynamics of microtubules : a model for caps and catastrophes. *Phys. Rev. Lett.*, 73: 2372-2375.
57. Flyvbjerg, H., Holy, T. E. et Leibler, S., 1996a. Microtubule dynamics : caps, catastrophes, and coupled hydrolysis. *Phys. Rev.*, 54: 5338-5560.
58. Flyvbjerg, H., Jobs, E. et Leibler, S., 1996b. Kinetics of self assembling microtubules : An "inverse problem" in biochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 5975-5979.
59. Francis, F., Koulakoff, F. K., Boucher, D., Chafey, P., Schaar, B., Vinet, M. C., Friocourt, G., McDonnell, N., Reiner, O., Kahn, A., McConnell, S. K., Berwald-Netter, Y., Denoulet, P. et Chelly, J., 1999. Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron*, 23: 247-256.
60. Fukushige, T., Siddiqui, Z. K., Chou, M., Culotti, J. G., Gogonea, C. B., Siddiqui, S. S. et Hamelin, M., 1999. MEC-12, an alpha-tubulin required for touch sensitivity in *C. elegans*. *J. Cell Sci.*, 112: 395-403.
61. Gao, Y., Vainberg, I. E., Chow, R. L. et Cowan, N. J., 1993. Two cofactors and cytoplasmic chaperonin are required for the folding of α - and β -tubulin. *Mol. Cell Biol.*, 13: 2478-2485.
62. Gard, D. L. et Kirschner, M. W., 1987. Microtubule assembly in cytoplasmic extracts of *Xenopus* oocytes and eggs. *J. Cell Biol.*, 105: 2191-2201.
63. Garel, J. R., Job, D. et Margolis, R. L., 1987. Model of anaphase chromosome movement based on polymer-guided diffusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 3599-3603.

64. Garin, J., Diez, R., Kieffer, S., Dermine, J.-F., Duclos, S., Gagnon, E., Sadoul, R., Rondeau, C. et Desjardin, M., 2001. The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J. Cell Biol.*, 152: 165-180.
65. Garner, C. C. et Matus, A., 1988. Different forms of microtubule associated protein 2 are encoded by separate mRNA transcripts. *J. Cell Biol.*, 106: 779-783.
66. Garnier, C., Barbier, P., Gilli, R., Lopez, C., Peyrot, V. et Briand, C., 1998. Heat-shock protein 90 (hsp90) binds *in vitro* to tubulin dimer and inhibits microtubule formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 250: 414-419.
67. Gealhen, R. L. et Haley, B. E., 1977. Interactions of a photoaffinity analog of GTP with the proteins of microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 4375-4377.
68. Gonzales-Garay, M. L. et Cabral, F., 1995. Overexpression of an epitope-tagged β -tubulin in Chinese Hamster Ovary cells causes an increase in endogenous α -tubulin synthesis. *Cell Motil. Cytoskel.*, 31: 259-272.
69. Gonzalez, M., Cambiazo, V. et Maccioni, R. B., 1995. Identification of a new microtubule-interacting protein Mip90. *Eur. J. Cell Biol.*, 67: 158-169.
70. Guillaud, L., Bosc, C., Fourest-Lieuvin, A., Denarier, E., Pirollet, F., Lafanechère, L. et Job, D., 1998. STOP proteins are responsible for the high degree of microtubule stabilization observed in neuronal cells. *J. Cell Biol.*, 142: 167-179.
71. Hale, C. A., Rhee, A. C. et de Boer, P. A., 2000. ZipA-Induced bundling of FtsZ polymers mediated by an interaction between C-terminal domains. *J. Bacteriol.*, 182: 5153-5166.
72. Hamel, E., Batra, J. K. et Lin, C. M., 1986. Direct incorporation of guanosine-5'-diphosphate into microtubules without guanosine-5'-triphosphate hydrolysis. *Biochemistry*, 25: 7054-7062.
73. Hamel, E., Lustbader, J. et Lin, C. M., 1984. Deoxyguanosine nucleotides analogues : potent stimulators of microtubule nucleation with reduced affinity for the exchangeable nucleotide site of tubulin. *Biochemistry*, 23: 5314-5325.
74. Harada, A., Oguchi, K., Okabe, S., Kuno, J., Terada, S., Ohshima, T., Sato-Yoshikate, R., Takei, Y., Noda, T. et Hirokawa, N., 1994. Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature*, 369: 488-491.
75. Harrison, B. C., Marchese-Ragona, S. P., Gilbert, S. P., Cheng, N., Steven, A. C. et Johnson, K. A., 1993. Decoration of the microtubule surface by one kinesin head per tubulin heterodimer. *Nature*, 362: 73-75.
76. Hartl, F. U., 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381: 571-580.
77. Hayden, J. H., Boower, S. S. et Rieder, C. L., 1990. Kinetochores capture astral microtubules during chromosome attachment to the mitotic spindle: direct visualization in live newt lung cells. *J. Cell Biol.*, 111: 1039-1045.
78. Hirokawa, N., 1994. Microtubule organization and dynamics depend on microtubule associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6: 74-81.
79. Hitt, A. L., Cross, A. R. et William, R. C., 1990. Microtubule solutions display nematic liquid crystalline structure. *J. Biol. Chem.*, 265: 1639-1647.
80. Holy, T. E. et Leibler, S., 1994. Dynamic instability of microtubules as an efficient way to search in space. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 5682-5685.
81. Horesh, D., Sapir, T., Francis, F., Wolf, S. G., Caspi, M., Elbaum, M., Chelly, J. et Reiner, O., 1999. Doublecortin, a stabilizer of microtubules. *Hum. Mol. Genet.*, 9: 1599-1610.
82. Horio, T. et Hotani, H., 1986. Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark field microscopy. *Nature*, 321: 605-607.
83. Howell, B., Larsson, N., Gullberg, M. et Cassimeris, L., 1999. Dissociation of the tubulin-sequestering and microtubule catastrophe-promoting activities of oncoprotein 18/stathmin. *Mol. Biol. Cell*, 10: 105-118.

84. Hyman, A. A., Salser, S., Drechsel, D., Unwin, N. et Mitchison, T. J., 1992. The role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyseable analogue GMPCPP. *Mol. Cell Biol.*, 3: 1155-1167.
85. Infante, A. S., Stein, M. S., Zhai, Y., Borisy, G. G. et Gundersen, G. G., 2000. Detyrosinated (Glu) microtubules are stabilized by an ATP-sensitive plus-end cap. *J. Cell Sci.*, 113: 3907-3919.
86. Janin, J. et Delepierre, M., 1994. Biologie structurale - Principes et méthodes biophysiques. Hermann, Paris, 319 pp.
87. Johnson, K. A. et Borisy, G. G., 1977. Kinetic analysis of microtubule self-assembly *in vitro*. *J. Mol. Biol.*, 117: 1-31.
88. Jourdain, L., Curmi, P., Sobel, A., Pantaloni, D. et Carlier, M.-F., 1997. Stathmin: a tubulin-sequestering protein which forms a ternary T2S complex with two tubulin molecules. *Biochemistry*, 36: 10817-10821.
89. Karasev, A. V., Kashina, A. S., Gelfand, V. I. et Dolja, V. V., 1992. HSP70-related 65 kDa protein of beet yellows closterovirus is a microtubule-binding protein. *FEBS Lett.*, 304: 12-14.
90. Keating, T. J. et Borisy, G. G., 2000. Immunostuctural evidence for the template mechanism of microtubule nucleation. *Nat. Cell Biol.*, 2: 352-357.
91. Keating, T. J., Peloquin, J. G., Rodionov, V. I. et Borisy, G. G., 1997. Microtubule release from the centrosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 5078-5083.
92. Kikkawa, M., Ishikawa, T., Nakata, T., Wakabayashi, T. et Hirokawa, N., 1994. Direct visualization of the lattice seam both *in vitro* and *in vivo*. *J. Cell Biol.*, 127: 1965-1971.
93. Kikkawa, M., Ishikawa, T., Wakabayashi, T. et Hirokawa, N., 1995. Three dimensional structure of the kinesin head-microtubule complex. *Nature*, 376: 274-277.
94. Kinzler, K. W. et Vogelstein, B., 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87: 159-170.
95. Kirschner, M. W., Honig, L. S. et Williams, R. C., 1975. Quantitative electron microscopy of MT assembly *in vitro*. *J. Mol. Biol.*, 99: 263-276.
96. Kirschner, M. W. et Mitchison, T. J., 1986. Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell*, 45: 329-342.
97. Koshland, D. E., Mitchison, T. J. et Kirschner, M. W., 1988. Polewards chromosome movement driven by microtubule depolymerization *in vitro*. *Nature*, 331: 499-504.
98. Kuchnir-Fygenson, D., Braun, E. et Libchaber, A., 1994. Phase diagram of microtubules. *Phys. Rev.*, 50: 1579-1588.
99. Kuchnir-Fygenson, D., Flyvbjerg, H., Sneppen, K., Libchaber, A. et Leibler, S., 1995. Spontaneous nucleation of microtubules. *Phys. Rev.*, 51: 5058-5064.
100. Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
101. Lafanechère, L., Courtay-Cahen, C., Kawakami, T., Jacrot, M., Rudiger, M., Wehland, J., Job, D. et Margolis, R. L., 1998. Suppression of tubulin tyrosine ligase during tumor growth. *J. Cell Sci.*, 111: 171-181.
102. Lafanechère, L. et Job, D., 2000. The third tubulin pool. *Neurochem. Res.*, 25: 11-18.
103. Lange, B. M., Faragher, A. J., March, P. et Gull, K., 2000a. Centriole duplication and maturation in animal cells. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 49: 235-249.
104. Lange, B. M. H., Bachi, A., Wilm, M. et Gonzales, C., 2000b. Hsp90 is a core centrosomal component and is required at different stages of the centrosome cycle in *Drosophila* and vertebrates. *EMBO J.*, 19: 1252-1262.
105. Lange, G., Mandelkow, E. M., Jagla, A. et Mandelkow, E., 1988. Tubulin oligomers and microtubule oscillations. Antagonistic role of microtubule stabilizers and destabilizers. *Eur. J. Cell Biol.*, 178: 61-69.

106. Larsson, N., Segerman, B., Gradin, H. M., Wandzioch, E., Cassimeris, L. et Gullberg, M., 1999a. Mutations of oncoprotein 18/stathmin identify tubulin-directed regulatory activities distinct from tubulin association. *Mol. Biol. Cell*, 19: 2242-2250.
107. Larsson, N., Segerman, B., Howell, B., Fridell, K., Cassimeris, L. et Gullberg, M., 1999b. Op18/stathmin mediates multiple region-specific tubulin and microtubule regulating activities. *J. Cell Biol.*, 146: 1286-1302.
108. Lawler, S., 1998. If you need a shrink try stathmin/Op18. *Curr. Biol.*, 8: 212-214.
109. Leung, C. L., Sun, D., Zheng, M., Knowles, D. R. et Liem, R. K., 1999. Microtubule actin cross-linking factor (MACF): a hybrid of dystonin and dystrophin that can interact with the actin and microtubule cytoskeletons. *J. Cell Biol.*, 147: 1275-1286.
110. Liang, P. et MacRae, T. H., 1997. Molecular chaperones and the cytoskeleton. *J. Cell Sci.*, 110: 1431-1440.
111. Lim, C. K., 1986. Introduction to h.p.l.c. of small molecules. In: C.K. Lim (Editor), HPLC of small molecules : a practical approach. Practical Approach Series. IRL Press, Oxford, pp. 1-12.
112. Lim, S.-S., Sammak, P. J. et Borisy, G. G., 1989. Progressive and spatially differentiated stability of microtubules in developing neuronal cells. *J. Cell Biol.*, 109: 253-263.
113. Lin, C. M. et Hamel, E., 1987. Interrelationships of Tubulin-GDP and Tubulin-GTP in microtubule assembly. *Biochemistry*, 26: 7173-7182.
114. Lin, P. T., Gleeson, J. G., Corbo, J. C., Flanagan, L. et Walsh, C. A., 2000. DCAMKL1 encodes a protein kinase with homology to doublecortin that regulates microtubule polymerization. *J. Neurosci.*, 20: 9152-9161.
115. Linse, K. et Mandelkow, E. M., 1988. The GTP-binding peptide of beta-tubulin: localization by direct photoaffinity labelling and comparison with nucleotide-binding proteins. *J. Biol. Chem.*, 263: 15205-15210.
116. Llanos, R., Chevrier, V., Ronjat, M., Meurer-Grob, P., Martinez, P., Frank, R., Bornens, M., Wade, R. H., Wehland, J. et Job, D., 1999. Tubulin binding sites on γ -tubulin: identification and molecular characterization. *Biochemistry*, 38: 15712-15720.
117. Lombillo, V. A., Stewart, R. J. et McIntosh, J. R., 1995. Minus-end directed motion of kinesin coated microspheres driven by microtubule depolymerization. *Nature*, 373: 161-164.
118. Lopes, M. M., Miller, H. P., Young, N. D. et Bhuyan, B. K., 1997. Assesment of microtubule stabilizers by a semi-automated in vitro microtubule protein polymerization and mitotic block assay. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 41: 37-47.
119. Lowe, J. et Amos, L. A., 1998. Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature*, 391: 121-123.
120. Lu, C., Reedy, M. et Erickson, H. P., 2000. Straight and curved conformations of FtsZ are regulated by GTP hydrolysis. *J. Bacteriol.*, 182: 164-170.
121. MacRae, T. H., 1997. Tubulin post-translational modifications - Enzymes and their mechanisms of action. *Eur. J. Biochem.*, 244: 265-278.
122. Mandelkow, E., Schulthheiss, R. et Mandelkow, E. M., 1984. Assembly and three-dimensional image reconstruction of tubulin hoops. *J. Mol. Biol.*, 177: 507-529.
123. Mandelkow, E.-M., Lange, G., Jagla, A., Spann, U. et Mandelkow, E., 1988. Dynamics of the microtubule oscillator : role of nucleotides and tubulin-MAP interactions. *EMBO J.*, 7: 357-365.
124. Mandelkow, E.-M. et Mandelkow, E., 1985. Unstained microtubules studied by cryo-electron microscopy : substructure, supertwist and disassembly. *J. Mol. Biol.*, 181: 123-135.
125. Mandelkow, E.-M., Mandelkow, E. et Milligan, R. A., 1991. Microtubule dynamics and microtubule caps : a time-resolved cryo-electron microscopy study. *J. Cell Biol.*, 114: 977-991.

126. Margolis, R. L., 1981. Role of GTP hydrolysis in microtubule treadmilling and assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 1586-1590.
127. Margolis, R. L. et Wilson, L., 1981. Microtubule treadmills - possible molecular machinery. *Nature*, 293: 705-711.
128. Marszalek, J. R., Weiner, J. A., Farlow, S. J., Chun, J. et Goldstein, L. S. B., 1999. Novel dendritic kinesin sorting identified by different process targeting of two related kinesins: KIF21A and KIF21B. *J. Cell Biol.*, 145: 469-479.
129. Marx, A. et Mandelkow, E., 1994. A model of microtubule oscillations. *Eur. Biophys. J.*, 22: 405-421.
130. Matus, A., Bernhardt, R. et Hugh-Jones, T., 1981. High molecular weight microtubule-associated proteins are preferentially associated with dendritic microtubules in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 3010-3014.
131. McKinney, M. M. et Parkinson, A., 1987. A simple, non chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. *J. Immunol. Meth.*, 96: 271-278.
132. Melki, R., Rommelaere, H., Leguy, J., Vandekerckhove, J. et Ampe, C., 1996. Cofactor A is a molecular chaperone required for β -tubulin folding: functional and structural characterization. *Biochemistry*, 35: 10422-10435.
133. Métoz, F., Arnal, I. et Wade, R. H., 1997. Tomography without tilt: Three dimensional imaging of microtubule/motor complexes. *J. Struct. Biol.*, 118: 159-168.
134. Michel, L., Garin, J., Issartel, J.-P. et Vignais, P. V., 1989. Synthesis and properties of azidonitrophenyl pyrophosphate, a photoaffinity probe of the nucleotide binding sites of mitochondrial F₁-ATPase. *Biochemistry*, 28: 10022-10028.
135. Mimory-Kiyosue, Y., Shiina, N. et Tsukita, S., 2000. The dynamic behavior of APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules. *Curr. Biol.*, 10: 865-868.
136. Mitchison, T. J., 1993. Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science*, 261: 1044-1047.
137. Mitchison, T. J. et Kirschner, M. W., 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*, 312: 237-242.
138. Moritz, M., Braunfeld, M. B., Guénebat, V., Heuser, J. et Agard, D. A., 2000. Structure of the γ -tubulin ring complex: a template for microtubule nucleation. *Nat. Cell Biol.*, 2: 365-370.
139. Moritz, M., Braunfeld, M. B., Sedat, J. W., Alberts, B. et Agard, D. A., 1995. Microtubule nucleation by γ -tubulin-containing rings in the centrosome. *Nature*, 378: 638-640.
140. Mukherjee, A., Dai, K. et Lutkenhaus, J., 1993. Escherichia coli cell division protein FtsZ is a guanine nucleotide binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 1053-1057.
141. Mukherjee, A. et Lutkenhaus, J., 1998. Dynamic assembly of FtsZ regulated by GTP hydrolysis. *EMBO J.*, 17: 462-469.
142. Nickerson, J. A. et Wells, W. W., 1978. Association of nucleosidediphosphate kinase with microtubules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 85: 820-826.
143. Nogales, E., Downing, K. H., Amos, L. A. et Lowe, J., 1998a. Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nat. Struct. Biol.*, 5: 451-458.
144. Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R. et Downing, K. H., 1999. High-resolution model of the microtubule. *Cell*, 96: 79-88.
145. Nogales, E., Wolf, S. G. et Downing, K. H., 1998b. Structure of alpha-beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*, 391: 199-203.
146. Nogales, E., Wolf, S. G., Khan, I. A., Luduena, R. F. et Downing, K. H., 1995. Structure of tubulin at 6.5 Å and location of the taxol-binding site. *Nature*, 375: 424-427.
147. Oakley, B., 1995. A nice ring to the centrosome. *Nature*, 378: 555-556.
148. Oakley, B. R., 2000. An abundance of tubulins. *Trends Cell Biol.*, 10: 537-542.

149. **O'Brien, E. T. et Erickson, H. P., 1989.** Assembly of pure tubulin in the absence of free GTP : effect of magnesium, glycerol, ATP, and the non hydrolyzable GTP analogues. *Biochemistry*, 28: 1413-1422.
150. **O'Brien, E. T., Voter, W. A. et Erickson, H. P., 1987.** GTP hydrolysis during microtubule assembly. *Biochemistry*, 26: 4148-4156.
151. **Oosawa, F. et Higashi, S., 1967.** Statistical thermodynamics of polymerization and polymorphism of protein. *Progr.Theor. Biol.*, 1: 79-164.
152. **Oosawa, F. et Kasai, M., 1962.** A theory of linear and helical aggregations of macromolecules. *J. Mol. Biol.*, 4: 10-21.
153. **Ozon, S., Maucuer, A. et Sobel, A., 1997.** The stathmin family. Molecular and biological characterization of novel mammalian proteins expressed in the nervous system. *Eur. J. Biochem.*, 248: 794-806.
154. **Palmer, G. R., Clark, D. C., Bayley, P. M. et Satele, D. B., 1982.** A quasi-elastic laser light scattering study of tubulin and microtubule protein from bovine brain. *J. Mol. Biol.*, 160: 641-658.
155. **Papaseit, C., Pochon, N. et Tabony, J., 2000.** Microtubule self-organization is gravity-dependant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 8364-8368.
156. **Paturle, L., Wehland, J., Margolis, R. L. et Job, D., 1989.** Complete separation of tyrosinated, detyrosinated, and nontyrosinatable brain tubulin subpopulation using affinity chromatography. *Biochemistry*, 28: 2698-2704.
157. **Paturle-Lafanechère, L., Eddé, B., Denoulet, P., Van Dorselaer, A., Mazarguil, H., Le Caer, J.-P., Wehland, J. et Job, D., 1991.** Characterization of a major brain tubulin variant which cannot be tyrosinated. *Biochemistry*, 30: 10523-10528.
158. **Paturle-Lafanechère, L., Mannier, M., Trigault, N., Pirolet, F., Mazarguil, H. et Job, D., 1994.** Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies. *J. Cell Sci.*, 107: 1529-1543.
159. **Perrett, D., 1986.** Nucleotides, nucleosides and bases. In: C.K. Lim (Editor), HPLC of small molecules : a practical approach. Practical Approach Series. IRL Press, Oxford, pp. 221-259.
160. **Pirolet, F., Job, D., Margolis, R. L. et Garel, J.-R., 1987.** An oscillatory mode for microtubule assembly. *EMBO J.*, 6: 3247-3252.
161. **Raff, E. C., 1994.** The role of multiple tubulin isoforms in cellular microtubule function. In: J. Hyams and C.W. Lloyd (Editors), Microtubules. Modern Cell Biology. Wiley-Liss Inc., New York, pp. 85-109.
162. **Raff, E. C., Fackenthal, J. D., Hutchens, J. A., Hoyle, H. D. et Turner, F. R., 1997.** Microtubule architecture specified by a beta-tubulin isoform. *Science*, 275: 70-73.
163. **RayChaudhuri, D., 1999.** ZipA is a MAP-Tau homolog and is essential for structural integrity of the cytokinetic FtsZ ring during bacterial cell division. *EMBO J.*, 18: 2372-2383.
164. **Redeker, V., Levilliers, N., Schmitter, J.-M., Le Caer, J.-P., Rossier, J., Adoutte, A. et Bré, M.-H., 1994.** Polyglycylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules. *Science*, 266: 1688-1691.
165. **Redmond, T., Sanchez, E. R., Bresnick, E. H., Schlesinger, M. J. et Toft, D. O., 1989.** Immunofluorescence colocalization of the 90-kDa heat shock protein and microtubules in interphase and mitotic mammalian cells. *Eur. J. Cell Biol.*, 50: 66-75.
166. **Riederer, B. M., Pellier, V., Antonsson, B., Di Paolo, G., Stimpson, S. A., Lütjens, R., Catsicas, S. et Grenningloh, G., 1997.** Regulation of microtubule dynamics by the neuronal growth-associated protein SCG10. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 741-745.
167. **Rodionov, V. I. et Borisy, G. G., 1997.** Microtubule treadmilling in vivo. *Science*, 275: 215-218.

168. Ross, J., Müller, S. C. et Vidal, C., 1988. Chemical waves. *Science*, 240: 460-465.
169. Salmon, E. D., Leslie, R. J., Saxton, W. M., Karow, M. L. et McIntosh, J. R., 1984. Spindle microtubule dynamics in sea urchin embryos: analysis using a fluorescein-labeled tubulin and measurements of fluorescence redistribution after laser photobleaching. *J. Cell Biol.*, 99: 2165-2174.
170. Sambrook, J., Fritsch, E. F. et Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
171. Sammak, P. J. et Borisy, G. G., 1988. Direct observation of microtubule dynamics in living cells. *Nature*, 332: 724-726.
172. Sammak, P. J., Gorbsky, G. J. et Borisy, G. G., 1987. Microtubule dynamics *in vivo*: a test of mechanisms of turnover. *J. Cell Biol.*, 104: 395-405.
173. Sanchez, C., Padilla, R., Paciucci, R., Zabala, J. C. et Avila, J., 1994. Binding of heat-shock protein 70 (hsp70) to tubulin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 310: 428-432.
174. Saoudi, Y., Paintrand, I., Multigner, L. et Job, D., 1995. Stabilization and bundling of subtilisin-treated microtubules induced by microtubule associated proteins. *J. Cell Sci.*, 108: 357-367.
175. Saphir, T., Elbaum, M. et Reiner, O., 1997. Reduction of microtubule catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetylhydrolase subunit. *EMBO J.*, 16: 6977-6984.
176. Saunders, W., Hornack, D., Lengyel, V. et Deng, C., 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* kinesin-related motor Kar3p acts as at pre-anaphase spindle poles to limit the number and length of cytoplasmic microtubules. *J. Cell Biol.*, 137: 417-431.
177. Savage, C., Xue, Y., Mitani, S., Hall, D., Zakhari, R. et Chalfie, M., 1994. Mutations in the caenorhabditis elegans beta-tubulin mec-7: effects on microtubule assembly and stability. *J. Cell Sci.*, 107: 2165-2175.
178. Schatz, P. J., Pillus, L., Grisafi, P., Solomon, F. et Botstein, D., 1986a. Two functional α -tubulin genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* encode divergent proteins. *Mol. Cell Biol.*, 6: 3711-3721.
179. Schatz, P. J., Solomon, F. et Botstein, D., 1986b. Genetically essential and nonessential α -tubulin genes specify functionally interchangeable proteins. *Mol. Cell Biol.*, 6: 3722-3733.
180. Schmitz, K. S., 1990. An introduction to dynamic laser scattering by macromolecules. Academic Press, New York.
181. Schulze, E. et Kirschner, M. W., 1986. Microtubule dynamics in interphase cells. *J. Cell Biol.*, 102: 1020-1031.
182. Schulze, E. et Kirschner, M. W., 1988. New features of microtubule behaviour observed *in vivo*. *Nature*, 334: 356-359.
183. Schwartz, K., Richards, K. et Botstein, D., 1997. BIM1 encodes a microtubule-binding protein in yeast. *Mol. Biol. Cell*, 8: 2677-2691.
184. Shelden, E. et Wadsworth, P., 1993. Observation and quantification of individual microtubule behavior *in vivo*: microtubule dynamics are cell-type specific. *J. Cell Biol.*, 120: 935-945.
185. Shilstra, M. J., Bayley, P. M. et Martin, S. R., 1991. The effect of solution composition on microtubule dynamic instability. *Biochem. J.*, 277: 839-847.
186. Simon, J. R. et Salmon, E. D., 1990. The structure of microtubule ends during the elongation and shortening phases of dynamic instability examined by negative-stain electron microscopy. *J. Cell Sci.*, 96: 571-582.
187. Smith, D. S., Niethammer, M., Ayala, R., Zhou, Y., Gambello, M. J., Wynshaw-Boris, A. et Tsai, L. T., 2000. Regulation of cytoplasmic dynein behaviour and microtubule organization by mammalian Lis1. *Nat. Cell Biol.*, 2: 767-775.
188. Sosa, H. et Chrétien, D., 1998. Relationship between moiré patterns, tubulin shape, and microtubule polarity. *Cell Motil. Cytoskel.*, 40: 38-43.

189. **Spann, U., Renner, W., Mandelkow, E.-M., Bordas, J. et Mandelkow, E., 1987.** Tubulin oligomers and microtubule assembly studied by time-resolved X-ray scattering : Separation of pre-nucleation and nucleation events. *Biochemistry*, 26: 1123-1132.
190. **Spittle, C., Charasse, S., Larroque, C. et Cassimeris, L., 2000.** The interaction of TOGp with microtubules and tubulin. *J. Biol. Chem.*, 275: 29748-20753.
191. **Symmons, M. F., Martin, S. R. et Bayley, P. M., 1996.** Dynamic properties of nucleated microtubules : GTP utilisation in the sub-critical concentration regime. *J. Cell Sci.*, 109: 2755-2766.
192. **Tabony, J. et Job, D., 1992a.** Gravitational symmetry breaking in microtubular dissipative structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 6948-6952.
193. **Tabony, J. et Job, D., 1992b.** Microtubular dissipative structures in biological auto-organization and pattern formation. *Nanobiology*, 1: 132-147.
194. **Takei, Y., Kondo, S., Harada, A., Inomata, S., Noda, T. et Hirokawa, N., 1997.** Delayed development of nervous system in mice homozygous for disrupted microtubule-associated protein 1B (MAP1B) gene. *J. Cell Biol.*, 137: 1615-1626.
195. **Taylor, K. R., Holzer, A. K., Bazan, J. F., Walsh, C. A. et Gleeson, J. G., 2000.** Patient mutations in doublecortin define a repeated tubulin-binding domain. *J. Biol. Chem.*, 275: 34442-34450.
196. **Tian, G., Huang, Y., Rommelaere, H., Vandekerckhove, J., Ampe, C. et Cowan, N. J., 1996.** Pathway leading to correctly folded β -tubulin. *Cell*, 86: 287-296.
197. **Tirnauer, J. S. et Bierer, B. E., 2000.** EB1 proteins regulate microtubule dynamics, cell polarity, and chromosome stability. *J. Cell Biol.*, 149: 761-766.
198. **Tirnauer, J. S., O'Toole, E., Berrueta, L., Bierer, B. et Pellman, D., 1999.** Yeast Bim1p promotes the G1-specific dynamics of microtubules. *J. Cell Biol.*, 145: 993-1007.
199. **Towbin, H., Staehelin, T. et Gordon, J., 1979.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 4350-4354.
200. **Tran, P. T., Walker, R. A. et Salmon, E. D., 1997.** A metastable intermediate state of microtubule dynamic instability that differs significantly between plus and minus ends. *J. Cell Biol.*, 138: 105-117.
201. **Valiron, O., Caudron, N. et Job, D., Soumis.** Microtubule assembly dynamics. *Cell. Mol. Life Sci.*
202. **Vandecandelaere, A., Martin, S. R. et Bayley, P. M., 1995.** Regulation of microtubule dynamic instability by Tubulin-GDP. *Biochemistry*, 34: 1332-1343.
203. **Vasquez, R. J., Gard, D. L. et Cassimeris, L., 1994.** XMAP from *Xenopus* eggs promotes rapid plus end assembly of microtubules and rapid microtubule polymer turnover. *J. Cell Biol.*, 127: 985-993.
204. **Verde, F., Labbé, J.-C., Dorée, M. et Karsenti, E., 1990.** Regulation of microtubule dynamics by cdc2 protein kinase in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *Nature*, 343: 233-238.
205. **Vertessy, B. G., Bankfalvi, D., Kovacs, J., Low, P., Lehotzky, A. et Ovadi, J., 1999.** Pyruvate kinase as a microtubule destabilizing factor *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 254: 430-435.
206. **Voet, D. et Voet, J. G., 1995.** Biochemistry. John Wiley & Sons, Inc., 1361 pp.
207. **Vorobjev, I. A., Rodionov, V. I., Maly, I. V. et Borisy, G. G., 1999.** Contribution of plus and minus end pathways to microtubule turnover. *J. Cell Sci.*, 112: 2277-2289.
208. **Voter, W. A. et Erickson, H. P., 1984.** The kinetics of microtubule assembly. *J. Biol. Chem.*, 259: 10430-10438.
209. **Voter, W. A., O'Brien, E. T. et Erickson, H. P., 1991.** Dilution-induced disassembly of microtubules : relation to dynamic instability and the GTP cap. *Cell motil. cytoskel.*, 18: 55-62.

210. Wade, R. H., Pirollet, F., Margolis, R. L., Garel, J.-R. et Job, D., 1989. Monotonic *versus* oscillating microtubule assembly : a cryo-electron microscope study. *Biol. Cell*, 65: 37-44.
211. Walczak, C. E., 2000. Microtubule dynamics and tubulin interacting proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12: 52-56.
212. Walczak, C. E., Mitchison, T. J. et Desai, A., 1996. XKCM1: a *Xenopus* kinesin-related protein that regulates microtubule dynamics during mitotic spindle assembly. *Cell*, 84: 37-47.
213. Walker, R. A., O'Brien, E. T., Pryer, N. K., Soboeiro, M. F., Voter, W. A. et Erickson, H. P., 1988. Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy : rate constants and transition frequencies. *J. Cell Biol.*, 107: 1437-1448.
214. Walker, R. A., Pryer, N. K. et Salmon, E. D., 1991. Dilution of individual microtubules observed in real time *in vitro* : evidence that cap size is small and independent of elongation rate. *J. Cell Biol.*, 114: 73-81.
215. Walsh, J. L., Keith, T. J. et Knull, H. R., 1989. Glycolytic enzyme interactions with tubulin and microtubules. *Biochem. Biophys. Arch.*, 999: 64-70.
216. Watts, N. R., Sackett, D. L., Ward, R. D., Miller, M. W., Wingfield, P. T., Stahl, S. S. et Steven, A. C., 2000. HIV-1 Rev depolymerizes microtubules to form stable bilayered rings. *J. Cell Biol.*, 150: 349-360.
217. Wehland, J., Schröder, H. C. et Weber, K., 1986. Isolation and purification of tubulin tyrosine ligase. *Methods Enzymol.*, 134: 170-179.
218. Wehland, J. et Weber, K., 1987. Turnover of the carboxy-terminal tyrosine of α -tubulin and means of reaching elevated levels of detyrosination in living cells. *J. Cell Sci.*, 88: 185-203.
219. Wehland, J., Willingham, M. C. et Sandoval, I. V., 1983. A rat monoclonal antibody reacting specifically with the tyrosylated form of α -tubulin. I. Biochemical characterization, effects on microtubule polymerization *in vitro*, microtubule polymerization and organization *in vivo*. *J. Cell Biol.*, 97: 1467-1475.
220. Whitehead, C. M. et Salisbury, J. L., 1999. Regulation and regulatory activities of centrosomes. *J. Cell. Biochem.*, 32-33: 192-199.
221. Whitfield, C., Abraham, I., Ascherman, D. et Gottesman, M. M., 1986. Transfer and amplification of a mutant β -tubulin gene results in colcemid dependence: Use of the transformant to demonstrate regulation of β -tubulin subunits levels by protein degradation. *Mol. Cell Biol.*, 6: 1422-1429.
222. Wiese, C. et Zheng, Y., 2000. A new function for the γ -tubulin ring complex as a microtubule minus-end cap. *Nat. Cell Biol.*, 2: 358-364.
223. Wilson, L. et Jordan, M. A., 1994. Pharmacological probes of microtubule function. In: J. Hyams and C.W. Lloyd (Editors), *Microtubules. Modern Cell Biology*. Wiley-Liss Inc., New York, pp. 59-83.
224. Wolf, S. G., Nogales, E., Kikkawa, M., Gratzinger, D. et Hirokawa, N. D., 1996. Interpreting a medium-resolution model of tubulin: comparison of Zinc-sheet and microtubule structure. *J. Mol. Biol.*, 262: 485-501.
225. Yanagisawa, T., Hasegawa, S. et Mohri, H., 1968. The bound nucleotides of the isolated microtubules of sea-urchin sperm flagella and their possible role in flagellar movement. *Exp. Cell Res.*, 52: 86-100.
226. Yang, Y., Bauer, C., Strasser, G., Wollman, R., Julien, J. P. et Fuchs, E., 1999. Integrators of the cytoskeleton that stabilize microtubules. *Cell*, 98: 229-238.
227. Yang, Y., Dowling, J., Yu, Q. C., Kouklis, P., Cleveland, D. W. et Fuchs, E., 1996. An essential cytoskeletal linker protein connecting actin microfilaments to intermediate filaments. *Cell*, 86: 655-665.

228. Yue, L., Karr, T. L., Nathan, D. F., Swift, H., Srinivasan, S. et Lindquist, S., 1999. Genetic analysis of viable Hsp90 alleles reveals a critical role in drosophila spermatogenesis. *Genetics*, 151: 1065-1079.
229. Zambito, A. M. et Wolff, J., 1997. Palmitoylation of tubulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 293: 650-654.
230. Zeeberg, B. et Caplow, M., 1981. An isoenergetic exchange mechanism wich accounts for tubulin-GDP stabilization of microtubules. *J. Biol. Chem.*, 256: 12051-12057.
231. Zheng, Y. X., Wong, M. L., Alberts, B. et Mitchison, T. J., 1995. Nucleation of microtubule assembly by a γ -tubulin-containing ring complex. *Nature*, 378: 578-583.

TABLE DES MATIERES

I INTRODUCTION	1
I.1 LE CYTOSQUELETTE	1
I.2 LE CYTOSQUELETTE MICROTUBULAIRE	1
I.2.1 LA TUBULINE	2
I.2.2 DONNÉES STRUCTURALES SUR LES MICROTUBULES	5
I.3 L'ASSEMBLAGE DES MICROTUBULES IN VITRO	7
I.3.1 LES ÉLÉMENTS NÉCESSAIRES À L'ASSEMBLAGE DE MICROTUBULES	7
I.3.2 CINÉTIQUES D'ASSEMBLAGE	8
I.3.3 NUCLÉATION	9
I.3.4 ELONGATION	10
I.3.5 DÉASSEMBLAGE	11
I.3.6 LA DYNAMIQUE DES MICROTUBULES À L'ÉTAT STATIONNAIRE	12
I.3.7 LES SOLUTIONS MICROTUBULAIRES CONSTITUENT UN SYSTÈME DISSIPATIF	15
I.3.8 LES EFFECTEURS DE LA DYNAMIQUE MICROTUBULAIRE <i>IN VITRO</i>	16
I.4 LA DYNAMIQUE D'ASSEMBLAGE DES MICROTUBULES IN VIVO	18
I.4.1 ORGANISATION DU CYTOSQUELETTE <i>IN VIVO</i>	18
I.4.2 MODIFICATIONS POSTTRADUCTIONNELLES DE LA TUBULINE	21
I.5 LE CONTRÔLE DE LA DYNAMIQUE D'ASSEMBLAGE DES MICROTUBULES	22
I.5.1 EFFECTEURS CONTRÔLANT LA NUCLÉATION DES MICROTUBULES	22
I.5.2 STABILISATION DES MICROTUBULES	23
I.5.3 DÉSTABILISATION DES MICROTUBULES	26
I.5.4 INTÉGRATEURS DU CYTOSQUELETTE	27
I.5.5 PROTÉINES LIANT L'EXTRÉMITÉ DES MICROTUBULES	28
I.6 OBJECTIFS DE CETTE ÉTUDE	28
I.6.1 RÉ-ÉVALUATION DES PARAMÈTRES CONTRÔLANT LA DYNAMIQUE D'ASSEMBLAGE DES MICROTUBULES <i>IN VITRO</i>	29
I.6.2 RECHERCHE D'EFFECTEURS ENDOGÈNES CONTRÔLANT LA DYNAMIQUE D'ASSEMBLAGE – DÉASSEMBLAGE DES MICROTUBULES	29
I.6.3 RECHERCHE DE NOUVEAUX EFFECTEURS DE LA DYNAMIQUE D'ASSEMBLAGE DES MICROTUBULES.	29

II MATÉRIELS ET MÉTHODES **31**

II.1	PURIFICATION DE LA TUBULINE	31
II.2	TEST DE LA PC-TUBULINE.	32
II.3	FILTRATION SUR BIOGEL	33
II.4	PRÉPARATION DE TUBULINE-GTP	33
II.5	PRÉPARATION DE TUBULINE-GDP	34
II.6	ASSEMBLAGE DES MICROTUBULES À PARTIR DE TUBULINE-GTP	34
II.6.1	DOSAGE SUR FILTRE DE LA TUBULINE POLYMÉRISÉE	34
II.6.2	DOSAGE DE LA TUBULINE-GTP	35
II.6.3	DÉTERMINATION DE LA LONGUEUR ET DE LA CONCENTRATION DES MICROTUBULES.	35
II.7	ANALYSE DE L'ACTIVITÉ NUCLÉOTIDE DIPHOSPHATE KINASE	36
II.7.1	PURIFICATION DES NUCLÉOTIDES	36
II.7.2	SÉPARATION DES NUCLÉOTIDES-PHOSPHATE PAR HPLC	37
II.8	ELECTROPHORÈSE DE PROTÉINES EN CONDITIONS DÉNATURANTES (SDS-PAGE)	37
II.9	ELECTROTRANSFERT	38
II.10	DÉTECTION IMMUNOLOGIQUE DES PROTÉINES TRANSFÉRÉES SUR MEMBRANE DE NITROCELLULOSE	39
II.11	TYROSINATION DE LA TUBULINE	39
II.12	PURIFICATION DE PARTENAIRES DE LA TUBULINE PAR COLONNE D'AFFINITÉ	40
II.12.1	EXTRAITS TISSULAIRES ET CELLULAIRES	40
II.12.2	CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ	41
II.13	PHOSPHORYLATION DES PARTENAIRES DE LA TUBULINE PAR CDC2	43
II.14	ÉTABLISSEMENT DE CARTES PEPTIDIQUES PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE	43
II.14.1	PRÉPARATION DES BANDETTES D'ÉLECTROPHORÈSE	44
II.14.2	DIGESTION À LA TRYPSINE ET ANALYSE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE	44
II.14.3	ANALYSE DES CARTES PEPTIDIQUES PAR COMPARAISON AVEC LES BASES DE DONNÉES (LOGICIEL PEPTIDE SEARCH DE L'EMBL)	44
II.15	PRÉPARATION ET CARACTÉRISATION D'OLIGOMÈRES PONTÉS COVALEMENT DE TUBULINE	44
II.15.1	PRÉPARATION D'OLIGOMÈRES DE TUBULINE PONTÉS COVALEMENT	44
II.15.2	MESURES DE LIAISON ENTRE LES OLIGOMÈRES DE TUBULINE ET LE GTP	46
II.15.3	CARACTÉRISATION DES OLIGOMÈRES DE TUBULINE PAR DIFFUSION DE LUMIÈRE	46

**III RÉÉVALUATION DES FACTEURS CONTRÔLANT LA DYNAMIQUE
D'ASSEMBLAGE DES MICROTUBULES** **51**

III.1	RÉSULTATS	51
III.1.1	SYSTÈME EXPÉRIMENTAL	51
III.1.2	LA NUCLÉATION	55
III.1.3	L'ÉLONGATION	58
III.1.4	LE DÉSASSEMBLAGE	61
III.1.5	EFFET DE L'AJOUT DE TUBULINE-GDP	66
III.1.6	EFFET DU MAGNÉSIUM	69
III.2	DISCUSSION	71

**IV OBTENTION ET CARACTÉRISATION D'OLIGOMÈRES DE TUBULINE
STIMULANT LA NUCLÉATION DES MICROTUBULES** **75**

IV.1	OBTENTION D'OLIGOMÈRES DE TUBULINE STIMULANT LA NUCLÉATION	75
IV.1.1	PONTAGE COVALENT MODÉRÉ DE MICROTUBULES	75
IV.1.2	STIMULATION DE L'ASSEMBLAGE DE LA TUBULINE	76
IV.1.3	ABSENCE DE MICROTUBULES DANS LES SOLUTIONS STIMULANT LA NUCLEATION	77
IV.2	CARACTÉRISATION DES AMORCES DE NUCLÉATION	78
IV.2.1	ETUDE EN DIFFUSION DE LUMIÈRE	78
IV.2.2	ETUDE EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À TRANSMISSION PAR COLORATION NÉGATIVE	81
IV.2.3	ETUDE DES PROPRIÉTÉS DE LIAISON DES NUCLÉOTIDES	82
IV.3	EXPOSANT DE NUCLÉATION	84
IV.4	DÉSASSEMBLAGE	88
IV.5	DISCUSSION	88

V IDENTIFICATION DE PARTENAIRES DE LA TUBULINE **95**

V.1	PRINCIPE DE LA TECHNIQUE	96
V.2	RÉSULTATS	97
V.2.1	PROFIL D'ÉLUTION DE LA COLONNE	98
V.2.2	DÉPÔT DE DIFFÉRENTS TYPES D'EXTRAITS	100
V.2.3	PROFIL ÉLECTROPHORÉTIQUE DES SOLUTIONS DE COMPLEXES TUBULINE-PARTENAIRES	101
V.2.4	IDENTIFICATION DES PROTÉINES ÉLUÉES	102
V.3	DISCUSSION	104

V.3.1	EFFICACITÉ DE LA COLONNE	104
V.3.2	PROTÉINES IDENTIFIÉES	107
V.4	CONCLUSION	111
<u>VI CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u>		113
<u>ANNEXE 1 : COMPOSITION DES TAMPONS.</u>		117
<u>ANNEXE 2 : DILUTION DES ANTICORPS</u>		121
<u>ANNEXE 3 : SATURATION EN SULFATE D'AMMONIUM</u>		123
<u>ANNEXE 4 : ARTICLE PARU DANS LE <i>JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY</i></u>		125
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>		137

SUMMARY

Microtubules play a crucial role in cellular organisation and function. Microtubule assembly display puzzling non-linear features, like dynamic instability. Here, we intended first to determine the limiting factors of microtubule assembly, and second to identify new effectors of this process. The kinetics of the reaction were studied in simple experimental conditions, allowing simultaneous and precise measurement of all the parameters of the reaction. Our results indicate that the microtubule nucleation occurs in two steps : rapid and irreversible formation of tubulin oligomers then aggregation of these oligomers into a microtubule. The elongation rate of the microtubule appears to be independent of the GTP-tubulin concentration : this elongation rate is probably limited by structural properties of the microtubules. Finally, microtubule disassembly would occur through catastrophes, and would be triggered by tubulin oligomers. The tubulin oligomers controlling disassembly could possibly be the same as those controlling microtubule nucleation. We then produced tubulin oligomers triggering microtubule nucleation by a moderate covalent crosslinking of microtubules. These oligomers are constituted by lateral interactions of 10 tubulin dimmers, four of which aggregate to form a microtubule. Microtubules assembled in our conditions in the presence of nucleating tubulin oligomers do not spontaneously disassemble : these conditions are suitable to look for catastrophe factors. Finally, we developed an affinity chromatographic procedure to purify tubulin-binding proteins in a native state. Thus, these tubulin partners are amenable to functional tests. Peptide mapping and mass spectrometry allowed us to identify the purified proteins. Some are known to control microtubule assembly, but others are possibly new effectors of microtubule dynamics.

Keywords

Cytoskeleton – Microtubules – Assembly – Oligomers – Nucleation – Effectors

Résumé

Les microtubules jouent un rôle central dans l'organisation et la vie cellulaire. L'assemblage des microtubules présente des comportements non linéaires et mal compris comme l'instabilité dynamique. Nous avons voulu déterminer les paramètres limitant la réaction d'assemblage des microtubules, puis isoler des effecteurs de cette réaction. Des études cinétiques ont été réalisées dans des conditions expérimentales simples où tous les paramètres de la réaction ont été mesurés. D'après nos résultats, la nucléation des microtubules se produirait en deux étapes : formation rapide et irréversible d'oligomères de tubuline puis assemblage de ces oligomères en microtubules. La vitesse d'élongation des microtubules est indépendante de la concentration en tubuline-GTP : cette vitesse d'élongation est sans doute limitée par les propriétés structurales des microtubules. Enfin, le désassemblage des microtubules se produirait par catastrophes et serait stimulé par des oligomères de tubuline se formant au cours de la réaction. Dans une seconde partie, nous avons produit des oligomères de tubuline stimulant la nucléation des microtubules par pontage covalent modéré des microtubules. Ces oligomères sont constitués par assemblage latéral de 10 dimères de tubuline et s'agrègent par quatre pour former un microtubule. Les microtubules formés dans nos conditions en présence d'oligomères de nucléation ne désassemblent pas spontanément : ces conditions permettront de rechercher des facteurs de catastrophe. Enfin, nous avons développé une procédure chromatographique pour isoler des protéines liant la tubuline. Les partenaires de la tubuline sont isolés à l'état natif et se prêtent à des tests fonctionnels. L'utilisation des techniques de cartographie peptidique a permis d'identifier les protéines par spectrométrie de masse. Nous avons ainsi isolé des protéines connues pour contrôler la dynamique des microtubules, mais d'autres, inconnues restent à étudier.

Mots clés

Cytosquelette - Microtubules – Assemblage – Oligomères – Nucléation – effecteurs