



HAL
open science

Etude de mécanismes moléculaires et de lois physiques qui régissent l'auto-organisation des microtubules en réseaux ordonnés et complexes *in vitro*

Didier Portran

► **To cite this version:**

Didier Portran. Etude de mécanismes moléculaires et de lois physiques qui régissent l'auto-organisation des microtubules en réseaux ordonnés et complexes *in vitro*. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2012. Français. NNT : 2012GRENV045 . tel-00848199

HAL Id: tel-00848199

<https://theses.hal.science/tel-00848199v1>

Submitted on 25 Jul 2013

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie Cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Didier PORTRAN

Thèse dirigée par **Marylin VANTARD**

préparée au sein du **Laboratoire de physiologie cellulaire et végétale** dans l'**École Doctorale de chimie et sciences du vivant**

Etude de mécanismes moléculaires et de lois physiques qui régissent l'auto-organisation des microtubules en réseaux ordonnés et complexes *in vitro*

Thèse soutenue publiquement le **5 décembre 2012**, devant le jury composé de :

Mr Carsten JANKE

Directeur de recherche, Institut Curie, Paris.....Président

Mr Matthieu PIEL

Directeur de recherche, Institut Curie, Paris.....Rapporteur

Mr François NEDELEC

Directeur de recherche, E.M.B.L, Heidelberg.....Rapporteur

Mme Isabelle ARNAL

Chargée de recherche, G.I.N, Grenoble.....Examineur

Mme Marylin VANTARD

Directrice de recherche, L.P.C.V, Grenoble.....Membre



Sommaire

| | |
|--|-----|
| Sommaire | 0 |
| Remerciements | 3 |
| Liste des abréviations | 5 |
| Introduction | 7 |
| I. Les Microtubules | 10 |
| a. La structure des MTs | 10 |
| b. L'hétérodimère de tubuline | 11 |
| c. La cinétique d'assemblage de la tubuline | 12 |
| i. La nucléation | 13 |
| ii. L'élongation | 15 |
| iii. La phase stationnaire | 16 |
| d. Les propriétés dynamiques de MTs..... | 16 |
| i. Le treamilling | 16 |
| ii. L'instabilité dynamique..... | 17 |
| II. Les réseaux de MTs in vivo | 20 |
| a. Les différents types de réseaux de MTs <i>in vivo</i> | 20 |
| i. Les réseaux centrosomaux | 20 |
| ii. Les réseaux acentrosomaux..... | 22 |
| b. Les étapes de l'auto-organisation d'un réseau de MTs | 29 |
| i. La nucléation de MTs | 29 |
| ii. Le transport des MTs..... | 30 |
| iii. La capture et le co-alignement des MTs..... | 31 |
| III. Deux acteurs de l'auto-organisation des réseaux anti-parallèles de MTs | 33 |
| a. Les MAP65s | 33 |
| i. Les membres de la famille des MAP65s chez les plantes..... | 33 |
| ii. Leurs propriétés | 34 |
| iii. Les mécanismes de régulation de MAP65 <i>in vivo</i> | 37 |
| b. Les kinésines-14..... | 37 |
| i. Leurs propriétés | 39 |
| c. L'organisation des MTs : les MAP65s et les Kinésines-14 | 41 |
| IV. Les propriétés mécaniques des MTs | 44 |
| a. La flexibilité des MTs <i>in vitro</i> | 44 |
| i. Les différentes approches | 44 |
| ii. L'effet des drogues sur la rigidité des MTs..... | 48 |
| iii. L'état nucléotidique de la tubuline..... | 48 |
| iv. L'effet de la température | 48 |
| v. L'effet de la dynamique des MTs | 49 |
| vi. La structure anisotropique des MTs..... | 49 |
| vii. L'effet des protéines associées aux MTs..... | 50 |
| b. La flexibilité des MTs <i>in vivo</i> | 50 |
| Objectifs de la thèse | 55 |
| Introduction de mon travail de thèse | 57 |
| V. Résultats | 60 |
| a. Quantification of MAPs and molecular motor activity on geometrically controlled microtubule networks..... | 60 |
| i. Introduction | 60 |
| ii. Résumé de l'article de thèse | 63 |
| Article de recherche 1 | 65 |
| iii. Conclusions et perspectives | 99 |
| b. MAP65-1/Ase1 increase microtubule flexibility | 100 |

| | |
|---|------------|
| <i>i. Introduction</i> | 100 |
| <i>ii. Résumé de l'article de thèse</i> | 102 |
| Article de recherche 2 | 103 |
| <i>iii. Conclusions et perspectives</i> | 135 |
| <i>Conclusions et perspectives de mon travail de thèse</i> | 139 |
| Matériels et Méthodes | 142 |
| Références | 160 |
| Annexe | 174 |
| Résumé | 233 |

Remerciements

Je remercie Marylin Vantard pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et qui m'a encadré durant ces années de thèse. J'ai beaucoup appris à son contact et je la remercie de son implication.

Je remercie Manuel Théry pour avoir partagé avec moi un peu de son savoir scientifique et de son savoir faire. J'ai beaucoup apprécié son encadrement, sa créativité et sa positivité en toutes circonstances.

Je remercie Laurent Blanchoin, chef de l'équipe « physique du cytosquelette et de la morphogenèse », pour son encadrement scientifique, son implication auprès des étudiants et son dynamisme incroyable. Je le remercie également pour tout le soutien qu'il a pu m'apporter et les discussions que l'on a pu avoir.

Je remercie particulièrement Jérémie Gaillard pour m'avoir transmis une partie de son savoir faire et pour m'avoir aidée toute ces années dans mes travaux de thèse. Je le remercie également pour son précieux soutien, sa patience pour m'avoir appris la biochimie et les discussions passionnantes que nous avons pu avoir.

Mes remerciements vont également à Jean-Louis Martiel et Marcelo Zoccoler qui ont travaillé dur sur le modèle mathématique et le programme matlab qui m'ont permis de mesurer la flexibilité des MTs.

Merci à Emmanuelle Neumann pour m'avoir appris la microscopie électronique et pour avoir passé autant de temps sur mon projet.

Je tiens particulièrement à remercier Isabelle Arnal et Matthieu Piel qui ont suivi ma thèse en tant que rapporteur de mon comité de thèse et qui m'ont donné des conseils inestimables.

Merci à Virginie Stoppin-Mellet pour son encadrement et les discussions scientifiques que nous avons eu.

Je remercie bien sûr tous les membres de l'équipe qui m'ont soutenu et avec qui j'ai passé de très bons moments. L'ambiance au sein de cette équipe a vraiment été exceptionnelle et j'espère que cela continuera dans les années à venir.

Merci à Christian, Vincent, Anne-Céciles, Christophe, Zong, Thimothée, Rémi, Eva, Fabrice, Tobias, Mithila, Andreas, Aldo, Theo.

Je remercie également ma famille, tout particulièrement ma mère, et mes amis pour leur soutien infaillible et leur patience tout au long de cette aventure.

Liste des abréviations

APC : Anaphase promoting complex
Ase1 : Anaphase
ATK5 : Arabidopsis Thaliana Kinesin 5
BRB: Brinkley Reassembly Buffer
Cdk : Cyclin dependent kinase
Cin8 : Chromosome instability 8
CLASP : CLIP associated protein
CLIP170 : Cytoplasmic linker protein 170
EB1 : End Binding Protein 1
 γ -TUSC : Gamme Tubulin Sub Complex
 γ -TuRC : Gamma Tubulin Ring Complex
GDP : Guanosine diphosphate
GTP : Guanosine triphosphate
Lp : Longueur de persistance
MAP : Microtubule Associated Protein
MAP1 : Microtubule Associated Protein 1
MAP2 : Microtubules Associated Protein 2
MAP65-1 : Microtubule Associated Protien 65-1
MAP65-4 : Microtubule Associated Protien 65-4
MAPK : Microtubule Associated Protein Kinase
MTs : Microtubules
Ncd : Non Claret disjunctional
NEDD1 : Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated
PEG : Poly(éthylène)glycol
PPB : Preprophase Band
PLL : Polylysine
PRC1 : Protein Regulating Cytokinesis
Klp2 : Kinesin like protein 2
Tp : Tampon
TIRFm : Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy
XMAP215 : Xenopus Microtubule Associated Protein 215

Introduction

Le cytosquelette est constitué de différents réseaux de filaments qui permettent à la cellule de maintenir ou de modifier sa forme pour se déplacer d'un endroit à un autre, ou pour transporter des organites et des nutriments. Ils sont également impliqués dans la ségrégation des chromosomes en mitose et dans le processus de division cellulaire.

Différents types de filaments existent afin de répondre aux besoins de la cellule : les filaments d'actine qui sont impliqués par exemple dans la locomotion cellulaire, les filaments intermédiaires qui fournissent la force mécanique et la résistance au cisaillement et les MTs qui jouent un rôle dans le positionnement des organites, le transport intracellulaire et la mitose. Ces différents réseaux filamenteux sont dynamiques et adaptables, et présentent une persistance qui varie en fonction de leur rôle dans la cellule.

La structure de ces réseaux va grandement dépendre de tout un jeu de protéines accessoires qui relient ces filaments les uns aux autres et également à d'autres composants cellulaires. Ces protéines peuvent modifier leurs dynamiques, leurs propriétés mécaniques et leurs organisations.

L'assemblage des réseaux est assuré par la distribution des filaments qui sont eux-mêmes constitués par l'assemblage de sous-unités (unités de base). Ces sous-unités sont de petites tailles et peuvent diffuser très rapidement dans le cytoplasme contrairement aux filaments, ce qui permet à la cellule de réorganiser rapidement son cytosquelette, par exemple par un désassemblage des filaments à un endroit de la cellule afin d'assembler un nouveau réseau de filaments à une autre localisation.

Dans ce contexte le travail décrit ici traite de l'auto-organisation de réseaux de MTs. Ces réseaux vont présenter des architectures différentes dues à l'activité de différentes protéines associées (les MAPs pour « Microtubule Associated Proteins ») et en fonction des besoins de la cellule. Ils sont stables ou transitoires, dynamiques et très reproductibles.

Le but de mon travail de thèse a été d'étudier, dans un système biomimétique, les propriétés d'auto-organisation de réseaux de MTs en présence de protéines associées aux MTs (MAPs). Je me suis plus particulièrement intéressé à des MAPs de la famille des MAP65s qui sont des protéines qui vont ponter de façon anti-parallèle les MTs entre eux et former des faisceaux (Gaillard et al., 2008). Je me suis également intéressé à un moteur moléculaire de la famille des Kinesines-14, impliqué dans l'organisation du fuseau mitotique (établissement et maintien de la zone centrale du fuseau mitotique).

Afin d'étudier l'activité de ces MAPs dans la formation de réseaux de MTs géométriquement contraints comme ceux existant *in vivo*, j'ai mis au point une technique de micro-patterning permettant le contrôle spatial et polaire de l'élongation de MTs *in vitro*.

Dans l'introduction de ce manuscrit, je débiterai par la description de la tubuline et de l'assemblage des MTs, puis des réseaux de MTs connus dans différents types cellulaires. Je décrirai plus en détail les étapes de l'auto-organisation de réseaux anti-polaires de MTs par les MAP65s et les kinésines-14. Je discuterai ensuite les propriétés mécaniques des MTs et leurs implications sur l'organisation des réseaux. Pour finir je présenterai mes travaux de recherche portant sur l'organisation des réseaux de MTs en réseaux contraints, ainsi que sur l'auto-organisation des MTs en faisceaux en présence de MAP65s et leurs impacts sur la flexibilité des MTs.

I. Les Microtubules

a. La structure des MTs

Les MTs sont des tubes creux d'un diamètre extérieur de 25 nm qui présentent des longueurs variables allant de quelques microns à plusieurs centaines de microns. Ils sont assemblés par l'association non-covalente d'hétérodimères de tubuline α et β . Ces hétérodimères de tubuline ont une structure polarisée et s'associent en protofilaments qui représentent une sous-structure du MT (Figure 1A). Les protofilaments s'associent latéralement en un feuillet qui va se refermer pour former un tube de 25 nm de diamètre (Figure 1B). Celui-ci a une structure polaire : l'extrémité (+) expose les sous-unités β et l'extrémité (-) les sous-unités α (Mitchison, 1993 ; Fan et al., 1996). Cette polarité structurale induit une cinétique d'assemblage différente entre les extrémités (-) et (+) du MT.

In vitro on observe un nombre variable de protofilaments dans les MTs (de 9 à 16) (Chrétien et al., 1991) et ce nombre peut également varier le long d'un MT (Chrétien et al., 1992). La conformation préférentielle *in vivo* pour un MT est de 13 protofilaments (Ledbetter et al., 1964 ; Tilney et al., 1973 ; Evans et al., 1985) ce qui permet une conformation droite des protofilaments. On parle alors de «lattice B» (Figure 1A). Dans ce modèle, les protofilaments vont établir une interaction latérale qui se réalise entre tubulines de même type (α - α , β - β) avec un décalage dans le sens de la longueur. Cette conformation va produire une discontinuité, nommée « sillon », dans la structure de la paroi du MT où les interactions entre les dimères de tubuline du premier et dernier protofilament se font entre tubulines α et β (Figure 1A) (pour revue Wade et Hyman, 1997).

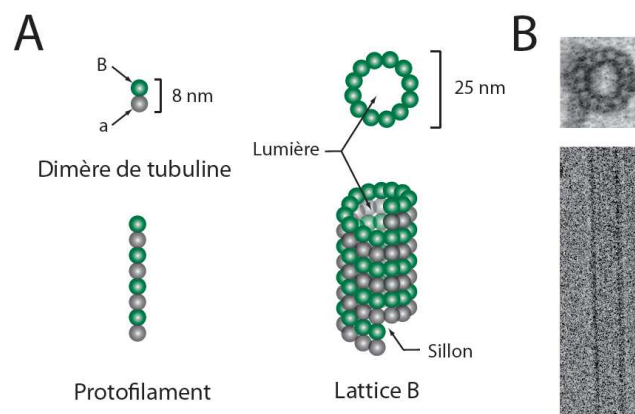


Figure 1 : Structure d'un MT. (A) Schéma représentant un dimère de tubuline (unité de base du MT) constitué d'un monomère de tubuline β et α , de 8 nm de longueur (gauche). Ces dimères s'associent en protofilaments pour constituer un feuillet de MT qui va se refermer pour former un tube de 25 nm de diamètre. (droite) Représentation schématique d'une lattice B d'un MT composé de 13 protofilaments, formant une ligne de suture pour refermer le feuillet du MT qui est appelé «sillon». (B) Image de microscopie électronique d'un MT en vue transversale (image du haut), et en vue longitudinale (image du bas) (Adapté de Alberts et al., 1994).

b. L'hétérodimère de tubuline

La tubuline est une GTPase. Les deux sous-unités α et β de tubuline ont chacune un site de liaison pour une molécule de GTP. Seule la molécule de GTP liée à la β -tubuline peut être hydrolysée ou échangée. Sur la tubuline α , la molécule de GTP est physiquement piégée à l'interface du dimère (Figure 2).

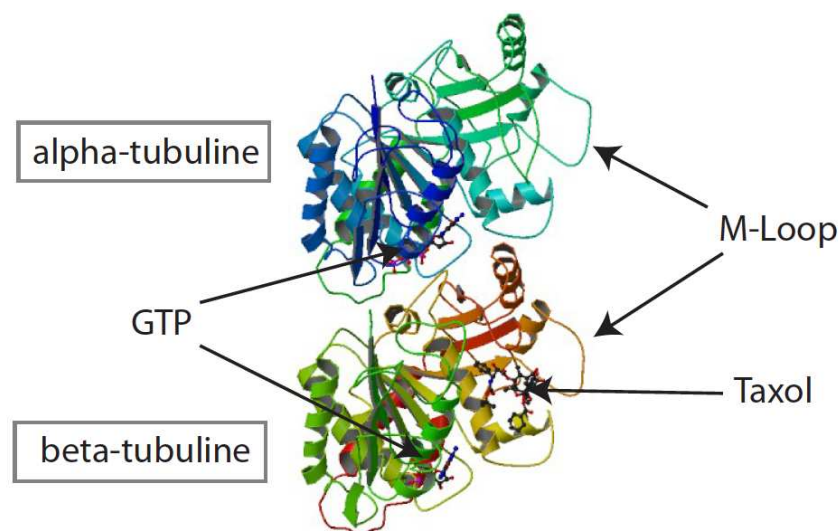


Figure 2 : La représentation tridimensionnelle de la structure du dimère de tubuline est extraite du logiciel Protein Workshop (www.rcsb.org/pdb) selon Nogales et al. (1998). Chaque monomère possède un site GTPase, mais le nucléotide lié à l' α -tubuline est piégé dans le dimère et est non hydrolysable. La β tubuline possède un site de liaison au taxol, et les deux M-loop permettent l'interaction latérale du dimère de tubuline avec un autre dimère (Adapté de Nogales et al., 1998 et 2001).

La structure de l'hétérodimère de tubuline a été résolue pour la première fois par Nogales et al, (1998) grâce à l'auto-assemblage de feuilletts de MTs 2D qui se forment en présence de zinc et qui sont stabilisés par du taxol. La constitution de ces feuilletts leur a permis d'étudier la structure de l'hétérodimère de tubuline en cristallographie.

Les deux monomères α et β de tubuline possèdent des homologies structurales qui sont quasiment superposables. Chaque monomère possède une paire de domaines globulaires de part et d'autre d'une hélice centrale H7 (Figure 2). Le domaine de liaison au GTP de chaque monomère interagit avec les hélices H6 et H7. Les hélices H11 et H12 localisées dans la partie C-Terminale de chaque monomère de tubuline, possèdent 13 et 9 résidus respectivement pour l' α -tubuline et la β -tubuline. Ces hélices présentent des structures désordonnées qui sont chargées négativement en condition physiologique et qui pourraient être impliquées dans l'interaction avec les MAPs et les moteurs moléculaires. La boucle qui connecte ces deux hélices semble aussi être importante pour l'interaction avec le monomère

de tubuline adjacent dans le protofilament.

Une des différences entre les tubulines α et β est la présence d'une lysine à l'extrémité inférieure de l'hélice H8 dans la β -tubuline. Cet acide aminé permettrait l'hydrolyse du GTP contrairement à l'acide glutamique présent sur l' α -tubuline. Une autre différence est une boucle L plus longue au niveau du domaine d'activation de l' α -tubuline. Cette boucle, sur la β -tubuline, produit un site de liaison au taxol.

Nogales et al., (1998) ont décrit trois domaines fonctionnels des monomères de tubuline : un domaine de liaison à la tubuline, un domaine liant les drogues (taxol), et un domaine de liaison aux MAPs et/ou moteurs moléculaires. A partir de leur modèle, ils émettent l'hypothèse que les interactions entre ces domaines sont très grandes. Cela implique qu'une modification sur l'un des domaines lorsqu'une drogue ou une MAP se lient pourraient induire d'autres modifications sur les domaines adjacents.

Parmi les nombreuses boucles qui sortent hors du domaine globulaire, certaines sont impliquées dans des interactions inter-protofilaments. Ainsi les boucles S7-H9 qui forment la « M-loop » interagissent avec les boucles H1-S2 du dimère adjacent.

L'observation des MTs en microscopie électronique a permis de mettre en évidence l'effet de l'hydrolyse de la molécule de GTP des dimères de tubuline sur la structure des MTs. Il en résulte une tension au sein du MT qui est stockée sous une forme d'énergie conformationnelle qui est libérée lorsque le MT dépolymérise. Lorsqu'un MT se désassemble suite à l'hydrolyse du GTP, les protofilaments s'enroulent pour former des anneaux qui se détachent du MT (Watts et al., 2002 ; Nogales et al., 2003). La visualisation en microscopie électronique des protofilaments qui forment des anneaux a donné lieu à une observation surprenante : il a été montré que la courbure se produit entre dimères de tubuline mais également au sein du dimère (Watts et al., 2002 ; Nogales et al., 2003 ; Gigant et al., 2000 ; Ravelli et al., 2004). Cette observation sous-entend un mécanisme de coopération le long du protofilament, qui peut expliquer les phases de désassemblage rapide des MTs. Cette courbure est restreinte lorsqu'ils sont en feuillets, la contrainte due à la présence de protofilaments voisins les maintient dans une conformation droite.

c. La cinétique d'assemblage de la tubuline

Une des caractéristiques de la tubuline est sa capacité d'auto-assemblage *in vitro* en présence de tubuline purifiée et de GTP. Lorsque la concentration de tubuline est supérieure à

la concentration critique d'assemblage, la tubuline forme des nucléus qui servent ensuite de base à l'élongation d'un MT. Cette concentration critique à l'assemblage est d'environ 10 μM dans les conditions généralement utilisées par la communauté scientifique (Tampon BRB80, Brinkley Reassembly Buffer) et à une température de 37°C pour la neurotubuline.

La cinétique d'assemblage d'une population de microtubules à une concentration donnée est caractérisée par une phase d'assemblage qui comprend, la nucléation des MTs, leur élongation, et une phase stationnaire qui correspond à un équilibre entre l'assemblage et le désassemblage des MTs (où la concentration de la tubuline est inférieure ou égale à la concentration critique). Le désassemblage peut-être induit par un facteur extérieur, tel que le froid, la dilution, les drogues ou encore des MAPs (dépolymérisation, fragmentation).

In vivo, la nucléation des MTs est liée à l'activité d'un complexe protéique composé de γ -tubuline et de protéines associées (γ -TuRC). Ce complexe ne permet que l'élongation de l'extrémité (+) des MTs. Il est localisé au centrosome, au spindle pole body ou sur le côté des MTs selon les types cellulaires (pour revue Kollman et al., 2011).

i. La nucléation

La nucléation des MTs *in vitro* passe par une étape d'oligomérisation de la tubuline qui est généralement une phase énergétiquement défavorable et lente (Figure 3), (Kollman et al., 2011). Elle passe par un assemblage de dimères de tubuline en protofilaments ou par l'association latérale d'oligomères de tubuline (Erickson et al., 1974 ; Kirshner et al., 1975 ; Job et al., 2003). Cette phase est dépendante de la concentration en tubuline et en GTP libre. L'association latérale des protofilaments ou des oligomères conduit à la formation de feuillets qui, une fois atteint un nombre suffisant de protofilaments, se referment pour constituer un tube, le MT.

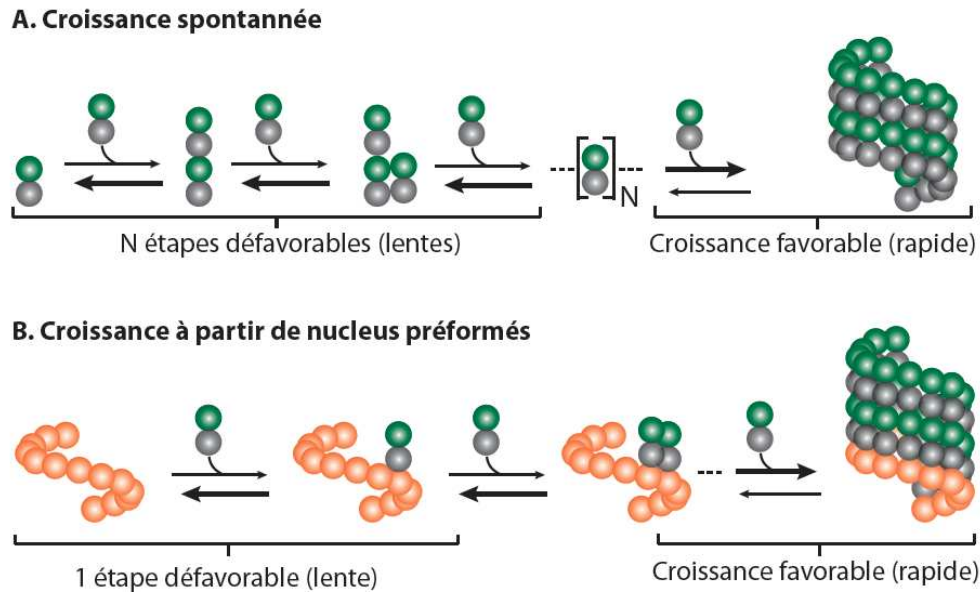


Figure 3 : L'assemblage des MTs. (A) La croissance spontanée des MTs *in vitro* se réalise en deux étapes : une première phase où les MTs passent par une oligomérisation des dimères de tubuline produisant des intermédiaires instables (phase lente), et une deuxième phase où l'oligomère est suffisamment stable pour permettre une élongation du MT (phase rapide). Les flèches en gras indiquent si l'étape est favorable à l'assemblage ou au désassemblage. (B) *In vivo*, la présence de nucleus préformés de MTs permet de réduire l'étape lente de nucléation et favorise la phase d'élongation. Ce mécanisme permet à la cellule d'avoir un contrôle spatial et temporel de la nucléation de nouveaux MTs (Adapté de la revue de Kollman et al., 2011).

In vivo, la concentration en tubuline est trop faible pour qu'elle puisse nucléer spontanément. La cellule a donc développé différents mécanismes dont le mieux décrit jusqu'ici est lié à l'activité de la γ -tubuline et de ses protéines associées. La γ -tubuline, membre de la famille des tubulines, est une protéine conservée chez tous les eucaryotes. Elle s'associe à d'autres protéines pour former un complexe, le γ -TuRC pour « γ -tubulin ring complexe » (Zheng Yet al., 1995). Ce complexe est composé des protéines GCP2, GCP3, GCP4, GCP5, GCP6, NEDD1 et de 12 molécules de γ -tubuline. Cet ensemble de protéines prend la forme d'un anneau de 25 nm de diamètre qui ressemble à la section transversale d'un microtubule. *In vitro*, en présence de γ -TuRC purifiés et de GTP, l'assemblage de tubuline est favorisé (Oegema et al., 1999)(Figure 4). Le γ -TuRC, sous des conditions de fortes concentrations salines se dissocie en sous-complexes de 300 KDa de γ -tubuline associés avec le GCP2 et le GCP3 ; ce sous-complexe est nommé γ -TUSC (Oegema K. et al., 1999)(Figure 4).

Dans les cellules animales, le complexe γ -TuRC est essentiellement localisé au centrosome, tandis que chez la plante il est localisé sur le côté des MTs corticaux en interphase (Murata et al., 2005, Pastoglia et al., 2007). Les levures ne possèdent pas de γ -TuRC, mais des γ -TUSC (Kern et al., 2002) localisés au « spindle pole body » (SPB) ou sur le

côté de MTs (Knop et al., 1997, Becker et al., 2005).

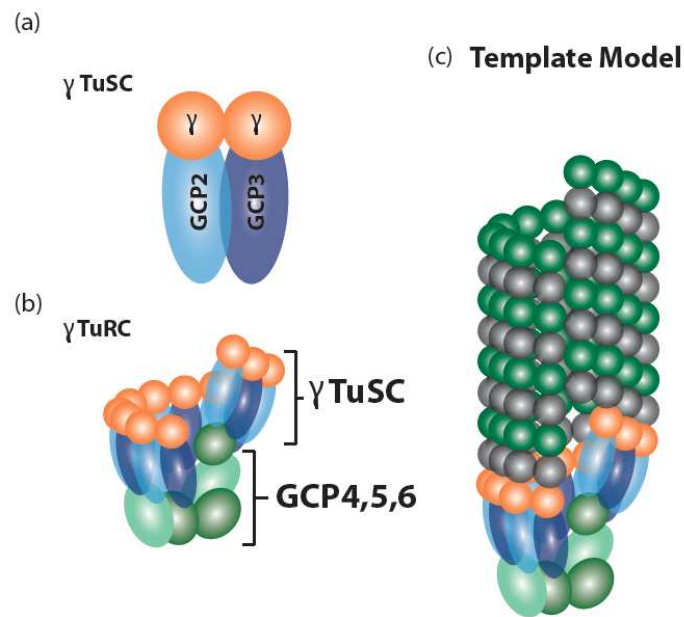


Figure 4 : Complexe γ -tubuline et les modèles pour leur assemblage et mode d'action. (a) Schéma représentant le « γ -tubuline small complex » (TuSC) qui est le noyau conservé de la machinerie nucléatrice des MTs. Ce complexe est constitué de deux copies de γ -tubuline et d'une « γ -tubuline complexe protein 2 » (GCP2) et 3 (GCP3). (b) Schéma représentant le modèle de l'assemblage du complexe γ -TuRC, qui est composé de plusieurs γ -TuSC qui s'assemblent avec les GCP4, GCP5 et GCP6 et organiseraient les complexes γ -TuSC en forme d'anneau. Dans ce modèle le γ -TuRC serait composé de 6 complexes γ -TuSC (12 γ -tubulines), ce qui laisserait un espace puisque les MTs sont formés de 13 protofilaments. Le «template model» est le modèle le plus largement accepté (Adapté de la revue de Kollman et al., 2011).

Ainsi la γ -tubuline *in vivo* permet à la cellule de maîtriser la nucléation et la localisation des MTs. Cependant, il existe d'autres mécanismes de nucléation des MTs dont l'implication et l'importance *in vivo* sont encore mal connues comme la stabilisation de protofilaments par des protéines associées aux MTs (MAPs) comme XMAP215 ou la MAP neuronal Tau (Popov et al., 2002, Sandoval et al., 1981).

ii. L'élongation

Une fois les amorces de MTs formées, elles vont progressivement s'allonger par ajout de dimères libres de tubuline-GTP à leurs deux extrémités *in vitro*. La vitesse de polymérisation est approximativement deux fois plus rapide à l'extrémité (+) qu'à l'extrémité (-) et va dépendre de la concentration de tubuline-GTP disponible (Walker et al, 1988). Des études de microscopie électronique des extrémités des MTs ont permis de montrer que leur croissance se fait par l'extension de protofilaments en forme de feuillets courbes plus ou moins longs en fonction de la quantité de tubuline-GTP disponible. Ce feuillet va par la suite

se replier naturellement en un tube le long de la ligne de suture du MT (Mandelkow et al., 1991 ; Chretien et al., 1995).

Cependant, même si la tubuline-GDP ne s'assemble pas pour former un MT, il a été montré récemment *in vitro* que si elle est en mélange avec de la tubuline-GTP, elle peut tout de même s'incorporer à l'extrémité d'un MT et altérer sa dynamique (Valiron et al., 2010).

iii. La phase stationnaire

L'état stationnaire est atteint lorsque la concentration en tubuline soluble atteint la concentration critique d'assemblage. Un équilibre entre dépolymérisation et polymérisation s'installe avec un ratio quasi constant entre la masse de tubuline libre et la masse de polymères (Mitchison et al., 1984).

d. Les propriétés dynamiques de MTs

i. Le treamilling

Le mécanisme du treamilling vient d'un équilibre entre la perte de dimères de tubuline à l'extrémité (-) du MT qui est compensée par leurs additions à l'extrémité (+) (Margolis et Wilson 1998 et 1981). Ceci permet au MT à l'état d'équilibre de conserver la même longueur en donnant l'illusion d'un mouvement (Figure 5). Le treamilling des MTs leur permet d'être transportés dans la cellule. Ce mécanisme de transport semble majoritaire dans le cortex cellulaire chez la plante, alors qu'il semble être d'avantage assuré par des moteurs moléculaires dans les cellules animales. Shaw et al., (2003) ont décrit chez la plante un treamilling dit « hybride » dû à l'existence d'une instabilité dynamique résiduelle aux extrémités des MTs, qui peut être rapide à l'extrémité (+) et lente à l'extrémité (-). Chez les animaux, ce mécanisme semble plus rare l'extrémité (-) des MTs étant le plus souvent « ancrée » au MTOC ou « coiffée » par une protéine d'extrémité (-).

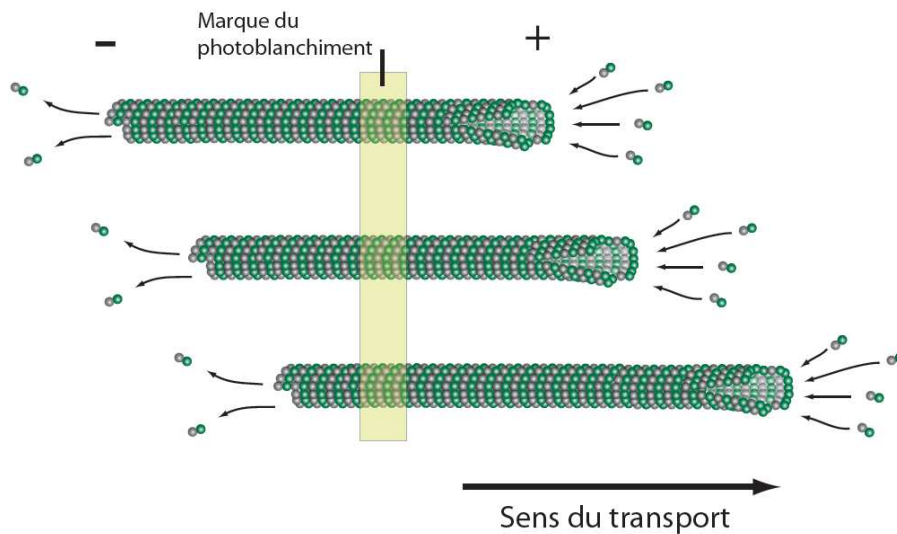


Figure 5 : Le treadmilling des MTs. Les MTs de plantes se déplacent grâce à une perte lente et régulière de sous-unités de tubuline à l'extrémité (-) et une polymérisation biaisée à l'extrémité (+). Une barre marquant une zone du MT produit par photoblanchiment de la fluorescence du MT reste à la même position. Ceci montre que le mouvement du MT par l'extrémité (+) est dû à un flux de sous-unités de tubuline aux extrémités du MT (adapté de Lyod et Chan, 2005).

ii. *L'instabilité dynamique*

L'instabilité dynamique a été pour la première fois décrite par Mitchison et Kirschner (1984). Ces auteurs ont observé qu'à l'état stationnaire (en concentration à l'équilibre de tubuline libre) et pour une masse de tubuline donnée, le nombre de MTs diminue dans le temps alors que leurs longueurs augmentent. Ils en ont déduit l'existence de deux phases dynamiques : une phase où une majorité de MTs vont polymériser lentement et une deuxième phase où les MTs vont rapidement dépolymériser. Ce comportement d'instabilité dynamique a été par la suite directement observé par Horio et Hotami (1986), qui ont décrit des phases d'élongation et de raccourcissement aléatoires. La transition entre les phases de polymérisation et dépolymérisation est appelée catastrophe et inversement, la transition entre les phases de dépolymérisation et de polymérisation est appelée sauvetage (Figure 6). Les fréquences de ces événements sont différentes entre les extrémités (+) et (-) des MTs.

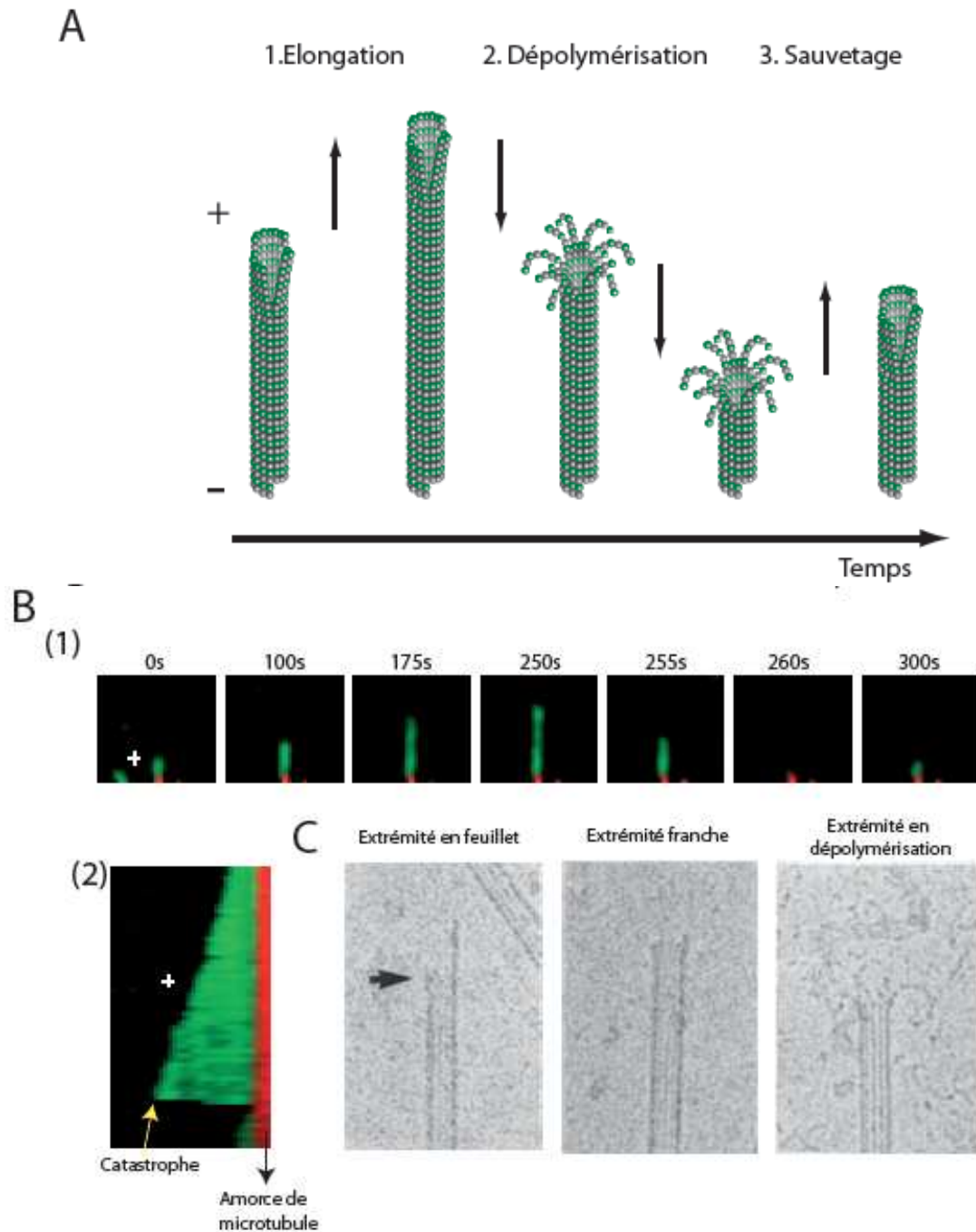


Figure 6 : L'instabilité dynamique des MTs. (A) Schéma représentant un MT polymérisant (1) à son extrémité (+). (2) Ce MT peut entrer dans une phase de dépolymérisation (catastrophe) de façon aléatoire, les protofilaments se dissociant de la lattice du MT en se courbant. (3) La dépolymérisation peut être stoppée et le MT peut alors recommencer à polymériser (événement de sauvetage). (B) (1) Séquence d'images montrant l'instabilité dynamique d'un MT (l'amorce stable GMPCPP du MT est marquée en rouge, et l'élongation du MT est marquée en vert). (2) Kymographe représentant l'historique de polymérisation et de dépolymérisation du MT. (C) Image de microscopie électronique représentant (de gauche à droite) des MTs en phase de polymérisation avec un feuillet à l'extrémité, une extrémité franche et un MT en phase de dépolymérisation avec les protofilaments courbes qui se dissocient de la lattice du MT (Adapté de Mandelkow et al., 1991).

Les paramètres exacts conduisant à ce comportement d'instabilité dynamique sont encore mal connus et semblent aléatoires. Cependant, l'étude de Walkers et al., (1988) a mis

en évidence que la dynamique des MTs est dépendante de la concentration de tubuline libre. Ils ont montré que la vitesse d'élongation aux deux extrémités du MT augmente avec la concentration de tubuline (avec une gamme de concentration allant de 7 à 15 μM). Lorsque la concentration de tubuline augmente, on observe également une diminution des fréquences de catastrophes qui s'accompagne d'une augmentation des événements de sauvetages. Walker et al., (1988) ont également décrit *in vitro* des « pauses » dans la dynamique des MTs sans élongation ni raccourcissement. Ces comportements de pauses des MTs semblent rares *in vitro* et de courte durée mais semblent persistants (quelques minutes) *in vivo* (Shulze et Kirschner 1988).

Le comportement d'instabilité dynamique des MTs peut-être modélisé en utilisant les paramètres cinétiques tels que : la vitesse de polymérisation et de dépolymérisation, les fréquences de catastrophes, de sauvetages et de pauses (Keller et al, 2008, Stoppin-Mellet, soumis, voir l'annexe).

In vivo l'instabilité dynamique des MTs est impliquée dans de nombreux phénomènes physiologiques, notamment le mécanisme de recherche et de capture des chromosomes lors de la division cellulaire (Mitchison and Kirschner 1985). Ce mécanisme peut permettre également aux MTs de se réorienter dans la cellule face à un obstacle (comme un organelle ou la membrane) ou encore de remodeler la structure du réseau de MTs très rapidement. L'instabilité dynamique des MTs peut être régulée par différentes protéines telles que les MAPs.

II. Les réseaux de MTs *in vivo*

Dans les cellules eucaryotes, les MTs sont organisés différemment en fonction du type cellulaire, de leur état de différenciation ou encore des étapes du cycle cellulaire. En interphase, il existe différentes configurations de réseaux de MTs. Deux types majeures d'organisation sont observés : centrosomale et acentrosomale. Un réseau de MTs issu d'un centrosome est radial. Ce réseau est impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la migration cellulaire, le positionnement d'organelles comme le golgi ou encore le réticulum endoplasmique (Cole and Lippincott-Schultz, 1995). Cependant, l'architecture radiale est limitée et ne permet pas des organisations de MTs diversifiées. L'organisation de MTs non connectés à un centrosome permet de développer une plus grande diversité d'architecture ce qui va permettre à la cellule d'acquérir des fonctions et des formes nouvelles. Par exemple, les cellules du tissu épithélial, qui présentent une forme allongée en colonne ont, en plus de leur réseau centrosomal des réseaux de MTs acentrosomaux. Ces MTs sont impliqués dans le transport vectorisé et polarisé de composants membranaires. Les cellules neuronales quand à elles ont développé des réseaux de MTs qui se chevauchent en faisceaux et qui permettent à l'axone de se différencier et de parcourir de longues distances. Ainsi, le développement de réseaux de MTs acentrosomaux par les cellules leur permet de mettre en place une plus grande diversité d'activités spécialisées.

a. Les différents types de réseaux de MTs *in vivo*

i. Les réseaux centrosomaux

Le centrosome est constitué d'une paire de centrioles et de matériel péricentriolaires qui contiennent des anneaux de complexes de γ -tubuline (γ -TuRCs) impliqués dans la nucléation des MTs, l'extrémité (-) des MTs étant ancrée au centrosome.

1. L'interphase

Au cours de l'interphase, les cellules animales n'ont qu'un seul centrosome qui produit un réseau de MTs qui irradient dans toute la cellule. La position du centrosome est intimement liée à la migration cellulaire (Wakida et al., 2010) (Figure 9A).

2. La mitose

Pour diviser correctement son génome, la cellule doit orchestrer la construction d'un fuseau mitotique bipolaire. Différents mécanismes sont impliqués dans l'assemblage du fuseau dont la nucléation des MTs par le centrosome et les kinétochores, la capture des MTs par les kinétochores et l'interdigitation des MTs (Gadde and Heald, 2004) (figure 7).

Le centrosome se duplique en phase S du cycle cellulaire. Chaque centrosome dupliqué migre de part et d'autre du noyau en phase G2 pour former, en prophase, deux asters qui vont définir les deux pôles du fuseau mitotique. A la rupture de l'enveloppe nucléaire, des MTs nucléés par les asters vont envahir l'espace nucléaire. Ils vont établir une connexion entre les deux asters par pontage de MTs interdigités et assurer la capture des chromosomes pour ultérieurement séparer le matériel génétique selon le mécanisme de recherche et capture (Mitchison et Kirschner, 1985 ; Gadde and Heald, 2004 ; Gundersen, 2002 ; Gundersen et al., 2004 ; Schuyler and Pellman, 2001) (figure 7).

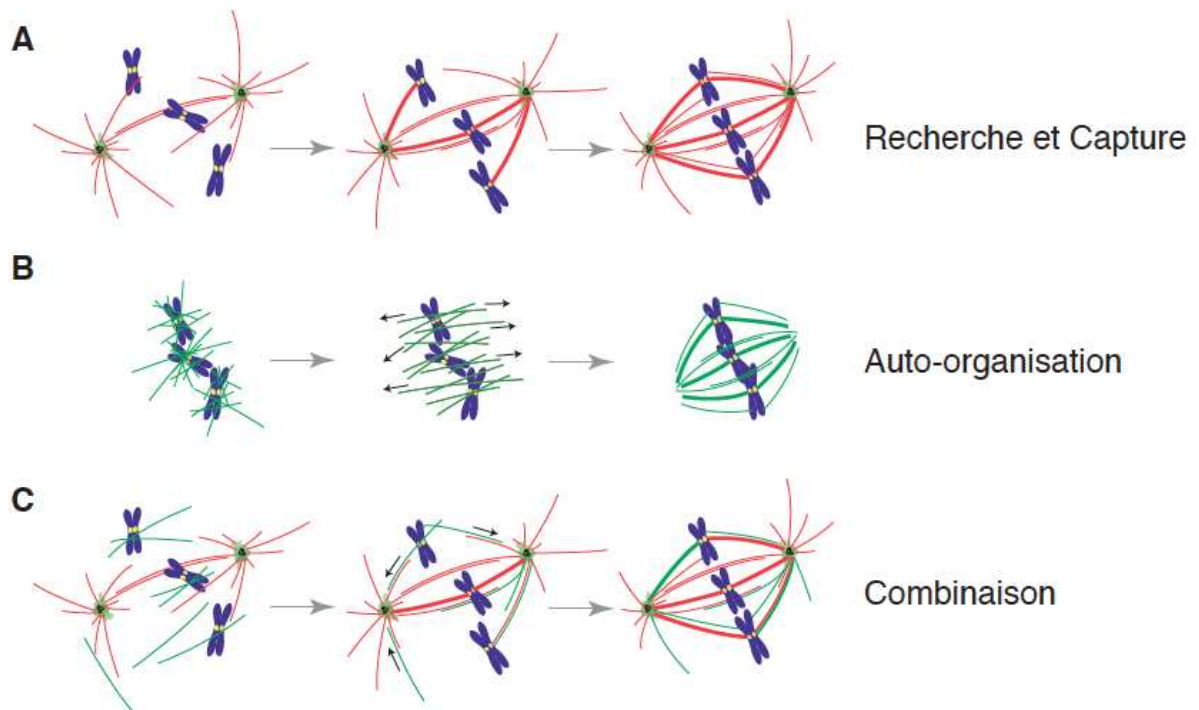


Figure 7 : Modèles d'assemblage du fuseau. (A) Recherche et Capture : les MTs sont nucléés à partir des centrosomes et établissent un contact avec les chromosomes et les kinétochores de façon non dirigée. Ils sont stabilisés pour former le fuseau. (B) Auto-organisation des MTs aléatoirement orientés sont nucléés en absence de centrosomes et sont organisés en un réseau bipolaire par des moteurs moléculaires. (C) Les deux modèles combinés : les MTs périphériques ou ceux émanant des chromosomes sont capturés et incorporés dans le réseau nucléé par les centrosomes pour générer le fuseau. Les MTs nucléés par les centrosomes sont marqués en rouge et les autres en vert (Adapté de Gadde et Heald, 2004).

3. Le cas particulier de la mitose

Durant la mitose les MTs qui irradient du centrosome (asters) vont s'interdigiter afin de former un réseau de MTs anti-parallèles dans la zone centrale du fuseau. Ce réseau est appelé « midzone ». La midzone du fuseau mitotique joue un rôle crucial dans l'établissement de la bipolarité du fuseau mitotique en connectant les deux pôles (asters) et dans le maintien de la stabilité du fuseau mitotique au cours de la mitose. Par ailleurs, la midzone définit la longueur du fuseau mitotique. En effet, au cours de l'anaphase, la midzone s'allonge alors que dans le même temps une poussée est exercée sur les deux pôles fusoriaux par les MTs pour les écarter l'un de l'autre (anaphase B). Cette étape, qui conduit à un allongement du fuseau mitotique via des contraintes mécaniques et une régulation fine de l'assemblage des MTs, est cruciale pour séparer correctement les chromosomes. Les mécanismes moléculaires qui régulent la formation de la midzone et sa longueur restent peu connus. Des études récentes ont identifié quelques protéines clés localisées à la midzone et impliquées dans son organisation et fonctionnement. Parmi elles, on observe les protéines associées aux MTs non motrices de la famille des MAP65s (MAP65-1/PRC1/Ase1) qui forment des associations latérales entre les MTs, ce qui conduit à leur organisation en faisceaux (Gaillard et al, 2008, Janson et al, 2007, Bieling et al, 2010). Des moteurs moléculaires (kinésines) tels que Eg5 et HSET/Ncd sont recrutés également à la midzone (Goshima et al., 2010). Ils participent à la régulation de sa structure et de sa longueur. En effet, les kinésines, en permettant le glissement des MTs interdigités les uns par rapport aux autres, produisent des forces mécaniques au sein du fuseau qui permettent d'éloigner les deux pôles l'un de l'autre ou au contraire de les rapprocher.

ii. Les réseaux acentrosomaux

Dans les réseaux acentrosomaux, l'extrémité (-) des MTs n'est pas connectée à un complexe de nucléation tel que le complexe γ -TuRC et est donc susceptible d'être dépolymérisée. En fonction du type cellulaire, la dynamique de ces extrémités peut-être différente. En effet, dans certaines cellules comme les fibroblastes, les extrémités (-) sont dynamiques (Grigoriev et al., 2006), alors qu'elles sont plus stables dans les cellules neuronales ou les cellules épithéliales (Pepperkok et al., 1990). Ces données suggèrent une régulation de la dynamique de ces extrémités *in vivo* par des protéines spécifiques. En effet lorsque l'on fragmente des MTs avec un laser UV, l'extrémité (-) des MTs ne se dépolymérise pas systématiquement tant *in vivo* qu'*in vitro* (Tao et al., 1988 ; Walker et al. 1989). Une étude récente a montré qu'une nouvelle protéine, la patronine protège l'extrémité (-) des MTs

face à la dépolymérisation induite par des kinesines-13 (Goodwin et al., 2010).

1. La méiose

Contrairement à la mitose qui utilise un réseau de MTs centrosomal, le fuseau méiotique dans la plupart des espèces animales et des cellules de plantes, s'assemble en l'absence de centrosome. L'établissement du fuseau de division en l'absence de centrosome a été principalement étudié chez la drosophile et le xénope (McKim and Hawley, 1995; Waters and Salmon, 1997). Dans ces fuseaux, après rupture de l'enveloppe nucléaire, les MTs s'organisent autour de la chromatine. Ils vont ensuite être organisés en un fuseau bipolaire par des moteurs moléculaires, et des protéines de pontage des MTs qui les stabilisent (Cullen and Ohkura, 2001; Gadde and Heald, 2004; Giunta et al., 2002; Matthies et al., 1996; McKim and Hawley, 1995).

Les mécanismes moléculaires qui permettent l'établissement d'un fuseau bipolaire, semblent être comparables à ceux mis en jeu pour assembler un fuseau mitotique acentrosomal. En effet, des études récentes ont montré qu'en l'absence de centrosome, par ablation laser ou par mutation dans des cellules de mammifères, le fuseau mitotique pouvait se constituer (Khodjakov et al., 2000 ; Basto et al., 2006).

2. La mitose chez les plantes

Chez les plantes, la mitose se distingue de celle des cellules animales par l'absence de centrosome aux pôles fusoriaux. Dans ces cellules, en phase G2, les MTs corticaux disparaissent progressivement alors que s'assemble un anneau de MTs, l'anneau préprophasique, dont le rôle est de définir la position du fuseau mitotique (axe de symétrie du fuseau mitotique et plan de division), (Figure 8).

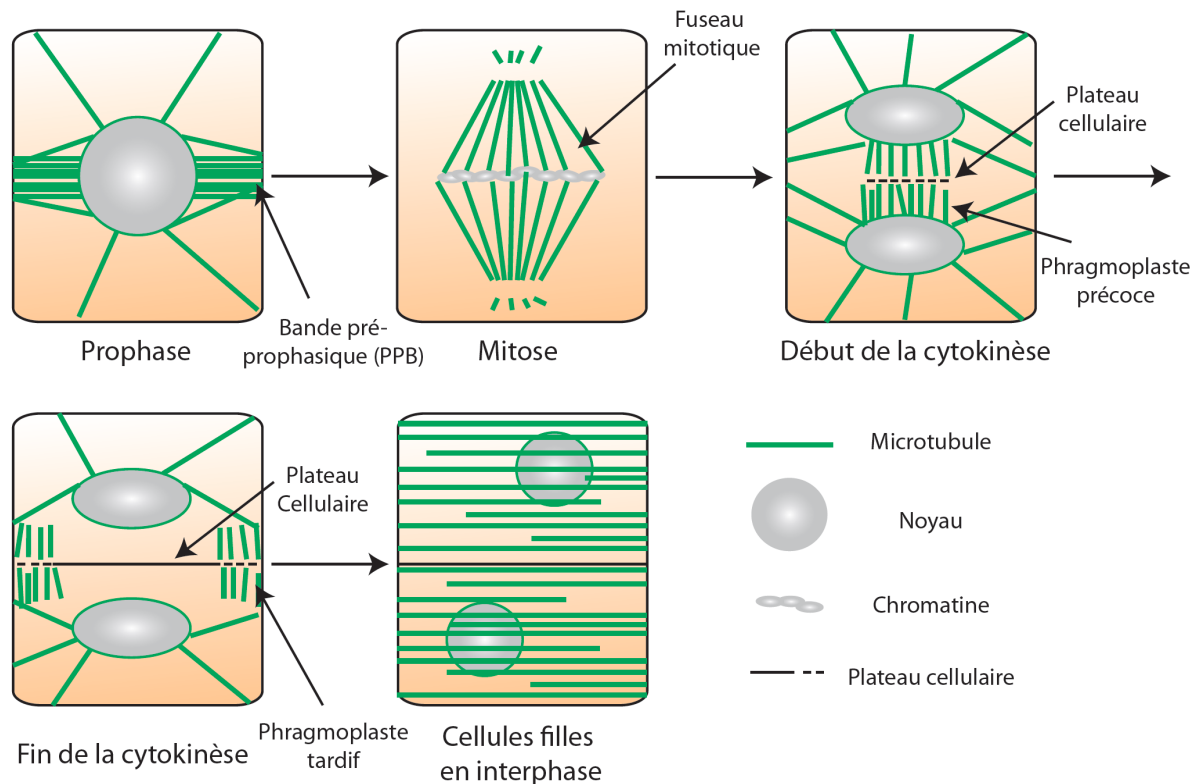


Figure 8 : Organisation du réseau de MTs durant la division des cellules de plante. L'organisation des MTs (en vert) lors des différentes étapes du cycle cellulaire en relation avec le noyau, les chromosomes (gris) et la plaque cellulaire (noire). L'anneau préprophasique (PPB) s'assemble durant la phase G2 au niveau du futur plan de division de la cellule et se désorganise en fin de prophase. En G2, le noyau en division se positionne au niveau du futur plan de division. En fin de cytokinèse, les deux noyaux fils sont connectés au cortex par des MTs. A la fin de la cytokinèse la plaque cellulaire se forme à l'endroit où le PPB a été précédemment assemblé.

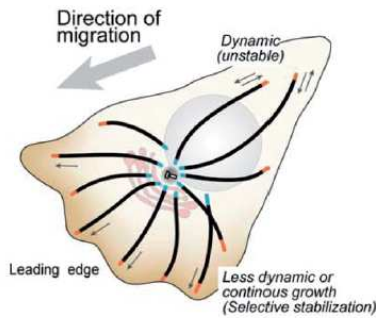
L'anneau préprophasique (PPB) est spécifique aux cellules de plantes. En G2, on observe également un assemblage accru de MTs autour du noyau ainsi que le recrutement de γ -tubuline à sa surface suggérant que ces MTs sont nucléés autour du noyau (Liu et al., 1993). Pour étayer cette hypothèse, il a été montré qu'*in vitro*, le noyau est un site de nucléation de MTs (Stoppin et al 1994). Lors des transitions G2-mitose, les MTs qui rayonnent à partir du noyau s'organisent progressivement en un pré-fuseau mitotique autour du noyau. A cette étape, le PPB disparaît (Mineyuki, 1999). Après rupture de l'enveloppe nucléaire, les fibres kinétochoriennes ainsi que des MTs interdigités se mettent en place et vont participer à la mise en place de la bipolarité du fuseau mitotique. Les mécanismes moléculaires de l'établissement du fuseau mitotique restent mal décrits dans ces cellules.

En l'absence de PPB, les cellules de plantes se divisent normalement, mais l'orientation du fuseau mitotique est perturbé (Bannigan et al., 2008; Chan et al., 2005).

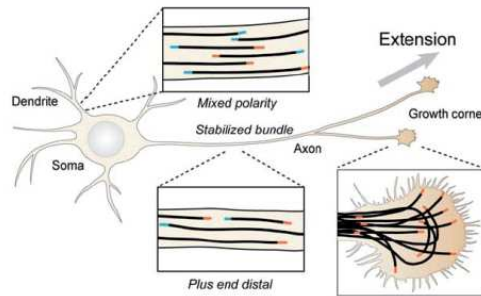
3. Les divers réseaux acentrosomiaux

Dans les cellules animales spécialisées, on observe généralement deux types de réseaux de MTs : les réseaux centrosomiaux mais également des réseaux acentrosomiaux. Ces derniers jouent un rôle dans l'établissement et le maintien de la forme spécialisée de la cellule. Plusieurs exemples sont décrits ci-dessous.

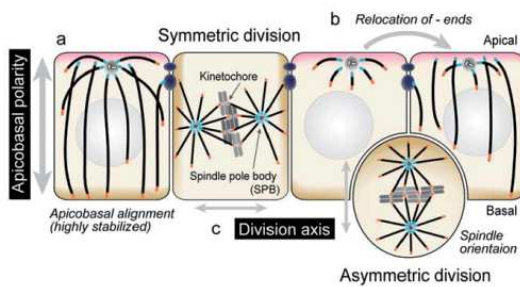
A. Migration dirigée



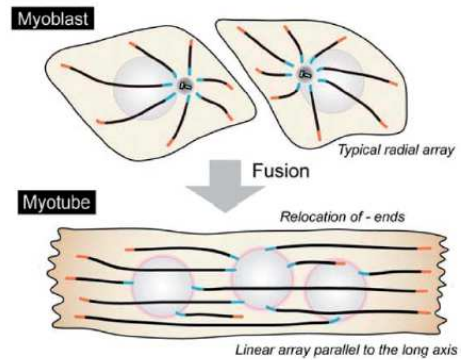
B. La cellule neuronale



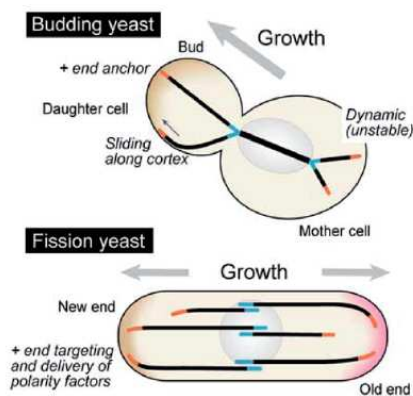
C. La cellule épithéiale polarisée



D. Différenciation des cellules musculaires



E. La levure



F. La cellule de plante

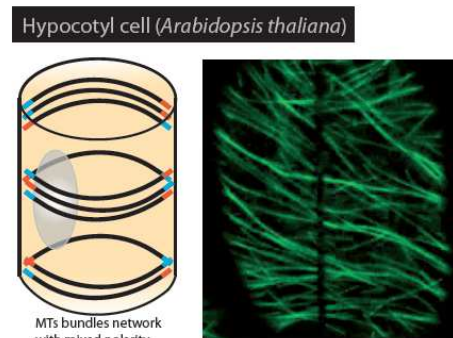


Figure 9 : Schéma d'architecture de cellules polarisées et d'organisation de MTs. Les organisations de réseaux de MTs centrosomiaux et acentrosomiaux pour différents types cellulaires sont représentées. La position des extrémités (+) et (-) sont représentées respectivement en orange et en bleu (adapté de Mimori-Kiyosue, 2011).

a. Les cellules épithéliales

Dans les cellules épithéliales, un réseau acentrosomal de MTs se forme pour permettre la polarisation de la cellule. En se polarisant, la cellule perd son réseau de MTs radial bien que le centrosome garde sa capacité à nucléer des MTs. Ces derniers ne sont plus connectés au centrosome : ils sont relâchés dans le cytoplasme après leur nucléation. De manière concomitante les facteurs permettant l'ancrage de l'extrémité (-) des MTs comme la γ -tubuline et la ninéine se redistribuent sous la membrane apicale de la cellule (Meads and Shroer, 1995 ; Lechler and Fuchs 2007). Les extrémités (-) des MTs sont ainsi attachées à la membrane apicale, tandis que les extrémités (+) des MTs vont polymériser vers la membrane basale (Figure 9C). Ce réseau linéaire acentrosomal contribue à la polarisation des cellules épithéliales par le transport et la maintenance de protéines (pour revue : Müsch, 2004 ; Boulan et al., 2005).

b. Les cellules neurales

Dans les cellules neurales, on observe également plusieurs réseaux de MTs, à la fois centrosomaux dans le corps basal de la cellule mais aussi acentrosomaux dans les dendrites et les axones. Des études en microscopie électronique ont montré que dans les axones et les dendrites, la plupart des MTs sont déconnectés du centrosome (Conde and caceres, 2009 ; Hoogenraad and Bradke, 2009). Dans les axones, les MTs semblent avoir la même orientation, tandis que dans les dendrites, certaines publications montrent une orientation anti-polaire des MTs (Baas et al., 1989 ; Baas et al., 1988 ; Jaworski et al., 2009 ; Stepanova et al., 2003 ; Rolls et al., 2007 ; Stone et al., 2008 ; Hoogenraad and Bradke 2009, Kapitein and Hoogenraad 2010) (Figure 9B).

Plusieurs mécanismes de nucléation des MTs dans les axones et les dendrites, non mutuellement exclusifs, ont été proposés :

1) nucléation des MTs à partir du centrosome, puis détachement du centrosome par une protéine de fragmentation comme la katanine (Baas et al 2005).

2) fragmentation des MTs nucléés par le centrosome en plusieurs courts MTs pour générer de nombreux MTs mobiles. Les MTs nouvellement générés vont ensuite être transportés par des moteurs moléculaires pour s'organiser dans les réseaux de MTs acentrosomaux (Keating et al., 1997)

3) nucléation acentrosomale de MTs par la γ -tubuline (Stiess et al., 2010). Cette hypothèse repose sur plusieurs études qui ont montré que l'axone pouvait se différencier en

l'absence de centrosome. Par exemple, Basto et al (2006) ont observé des neurones différenciés chez des mutants de drosophile ne possédant pas de centrosome. Stuess et al (2010) ont montré, par élimination du centrosome par un laser (nanoablation), que l'axone pouvait continuer de s'allonger. La γ -tubuline serait également présente dans l'axone et les dendrites et pourrait servir de nucléateur local (Stuess et al., 2010).

L'ensemble de ces données suggère que la nucléation des MTs pourrait ne pas s'effectuer uniquement au niveau du centrosome dans les cellules nerveuses.

c. Les myotubes

Les myotubes sont formés par la fusion de cellules précurseurs mononucléées : les myoblastes. Ces myoblastes possèdent un réseau de MTs centrosomal. Lors de la fusion pour former le myotube, le réseau de MTs se réorganise pour former un réseau acentrosomal linéaire et parallèle à l'axe longitudinal de la cellule (Figure 9D). Le matériel permettant la nucléation des MTs comme la γ -tubuline, la ninéine et la péricentrine est redistribué autour du noyau (Brugnard et al., 2005).

Ce réseau acentrosomal linéaire, composé de MTs anti-parallèles (Pizon et al., 2005) semble être impliqué dans la différenciation cellulaire au cours de la myofibrillogenèse, ainsi que dans l'établissement et le maintien de la forme allongée des cellules (Antin et al., 1981 ; Tassin et al, 1985 ; Pizon et al., 2005).

d. Les levures

Les levures sont des organismes unicellulaires qui possèdent uniquement quelques MTs parallèles à leur axe de croissance. L'organisation de ces MTs est régulée par la progression du cycle cellulaire.

Chez les levures de fission (i.e *s. pombe*) en interphase, les MTs sont organisés en 3 à 6 faisceaux composés chacun de 2 à 9 MTs de polarité opposée (Höög et al., 2007). Les faisceaux sont parallèles à l'axe de croissance de la cellule, avec leurs extrémités (+) dirigées vers les bords de la cellule et leurs extrémités (-) (zone d'interdigitation) vers la surface du noyau (Figure 9E). En interphase, la nucléation de nouveaux MTs s'effectue par des complexes γ -tubuline situés sur la lattice des MTs (Janson et al., 2005). Le réseau de MTs en interphase permet notamment le maintien de la polarité de la cellule et le positionnement centrale du noyau. En début de mitose, chez la « fission yeast » comme chez la « budding yeast », le spindle pole body (SPB) qui est intégré dans le noyau, se duplique. Les deux SPB

générés se séparent et se positionnent de part et d'autre du noyau. Ils vont définir les deux pôles du fuseau mitotique et participer à son assemblage. L'axe de division chez la « fission yeast » se situe au centre de la cellule alors que chez la « budding yeast », l'axe de division est déterminé par l'émergence du bourgeon. Chez ces cellules, les MTs nucléés à partir du « vieux » SPB vont s'attacher sélectivement à la pointe du bourgeon ce qui va permettre la bonne séparation du matériel génétique entre le bourgeon et la cellule mère (Figure 9E) (pour revue : Chang et Martin 2009 et Markus et al., 2012).

e. Les plantes

Contrairement aux types cellulaires précédemment décrits, les plantes ne possèdent pas de centre organisateur de MTs (MTOC) structurés comme le centrosome ou le SPB. En interphase, les MTs sont dispersés dans le cortex cellulaire en un espace essentiellement 2D qui interagit avec la membrane plasmique (Wasteneys, 2002 ; Ehrhardt et al., 2006). Chez la plante, l'expansion de la cellule ne se fait pas par la déformation directe de la membrane par le cytosquelette mais par extension de la paroi cellulaire. Le réseau de MTs corticaux influence indirectement les axes d'expansions cellulaires en spécifiant l'orientation des microfibrilles de cellulose *via* les complexes de synthèse de cellulose localisés à la membrane (pour revue Baskin, 2001). Les MTs corticaux sont organisés en faisceaux distribués majoritairement de façon perpendiculaire à l'axe d'élongation des cellules épithéliales de tiges et de racines (Figure 9F). Au sein des faisceaux, la polarité des MTs est mixte (Van Damme et al., 2004, Lucas et Shaw, 2011). Dans ces cellules, l'interaction MT-MT et MT-cortex est primordiale pour la mise en place d'une auto-organisation stable et reproductible du réseau de MTs. Par des approches de génétiques et d'imageries cellulaires, il a été identifié trois types de protéines considérées jusqu'ici comme étant essentielles à l'établissement de ces connections : les protéines de la superfamille des XMAP215 (MOR1), des CLASP (Clasp, protéines de l'extrémité (+) des MTs) et de la famille des MAP65s (notamment MAP65-1), (pour revue Hamada, 2007). MOR1 a été suggérée pour réguler la polymérisation et la dépolymérisation des MTs (Kawamura et al., 2008). Une étude récente montre que CLASP pourrait réguler l'interaction entre le cortex cellulaire et les MTs (Ambrose et al., 2008). Enfin, des membres de la famille des MAP65s pourraient organiser les MTs en faisceaux (Chan et al., 1999) (pour revue Takahiro Hamada 2007).

L'absence de centre organisateur de MTs dans les cellules de plante en font un système pertinent pour la compréhension de l'auto-organisation de réseaux de MTs acentrosomaux.

Comme nous venons de le décrire, les cellules eucaryotes ont une grande diversité de réseaux de MTs, et leurs organisations singulières, centrosomales ou acentrosomales soulignent leurs implications essentielles dans la morphogenèse cellulaire. La constitution de ces réseaux est réalisée par de nombreux mécanismes qui peuvent être redondant permettant d'assurer une reproductibilité de l'architecture de ces structures. La géométrie d'organisation des réseaux peut s'établir à partir de structure pré-établie comme le MTOC (centrosome, SPB) ou à partir de MTs pré-existants. Les réseaux de MTs acentrosomaux sont constitués majoritairement de MTs organisés en faisceaux. La manière dont ces cellules organisent ces géométries de réseaux et le rôle des MAPs associées restent assez peu connus.

b. Les étapes de l'auto-organisation d'un réseau de MTs

Si les processus menant à la structuration des différents réseaux de MTs présentés ci-dessus restent peu décrits, des études de l'auto-organisation de réseaux de MTs acentrosomaux en interphase ont permis de mettre en évidence trois étapes clés : 1) la nucléation des MTs à partir de sites spécifiques suivi de leur détachement 2) leur transport dans le cytoplasme et 3) l'organisation en réseaux.

i. La nucléation de MTs

Dans les cellules acentrosomales de plantes, les MTs sont nucléés à partir de complexes de γ -tubuline localisés sur le côté de MTs pré-existants (Murata et al., 2005 ; Chan et al., 2009) (Figure 10). Dans ces cellules, ils forment un angle de 40° avec le MT « mère ». Les MTs « fils » sont détachés par l'activité de la katanine (Nakamura et al., 2010). Chez la levure *S. pombe*, la nucléation des MTs est assez similaire, avec des complexes γ -TuCs localisés sur la lattice de MTs pré-existants (Janson et al., 2005). Un certain nombre d'observations *in vivo* ont également montré l'existence d'un tel mécanisme dans les myotubes (Bugnard et al., 2005).

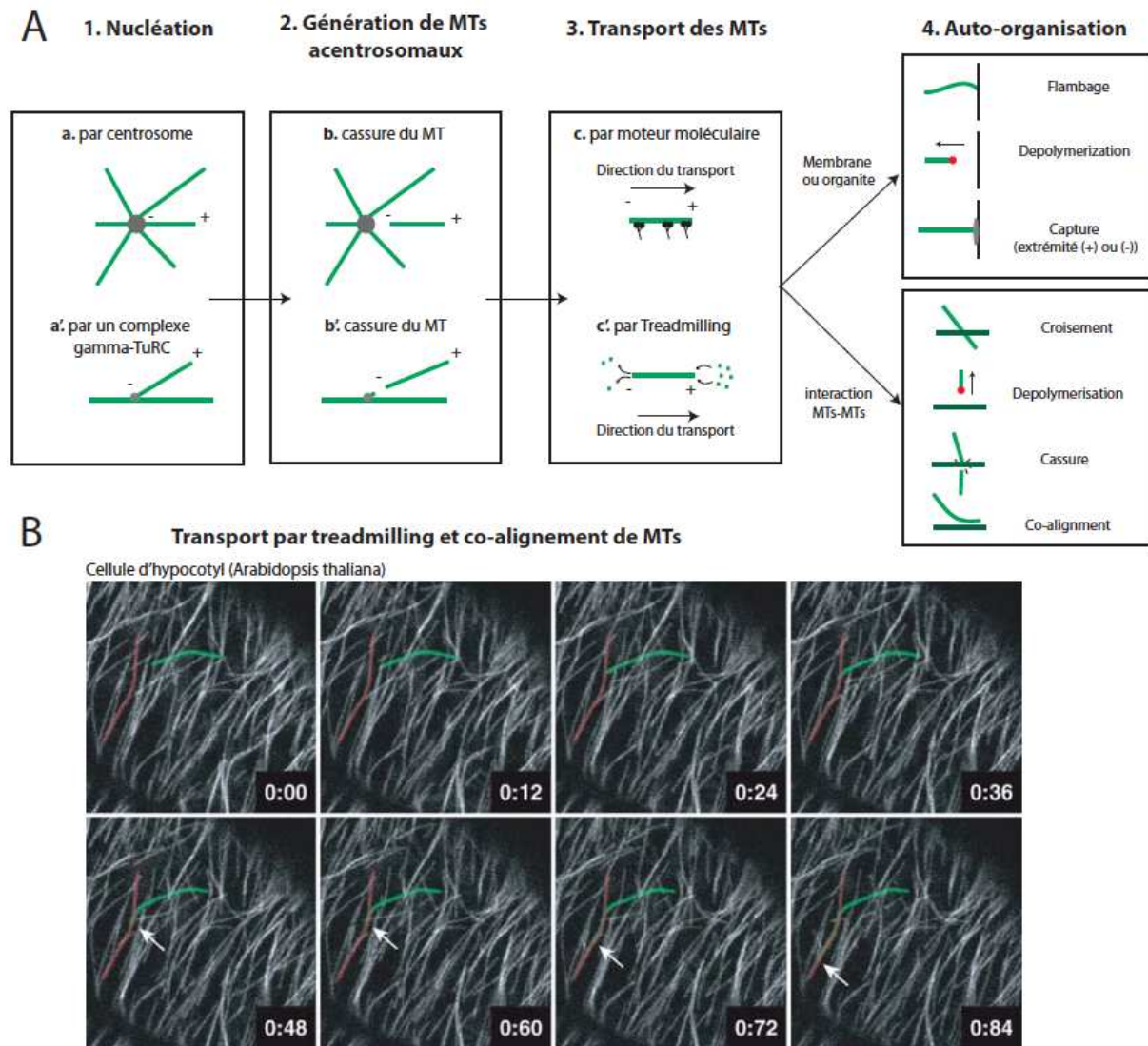


Figure 10 : (A) Schéma récapitulatif des principales étapes menant à l'auto-organisation d'un réseau de MTs *in vivo* (Adapté de Wasteney and Ambrose, 2009 et Keating et Borisy, 1999). (B) Séquence d'images d'un réseau de MTs cortical (cellule d'hypocotyl d'*Arabidopsis Thaliana*). Deux MTs, l'un indiqué en vert qui se déplace par treadmilling et se co-aligne avec un MT stable (résident) indiqué en rouge (Adapté de Ehrhardt et Shaw, 2006).

ii. Le transport des MTs

Le transport de MTs nouvellement nucléés vers les zones où ils formeront un réseau organisé peut s'effectuer de deux manières : le transport par des moteurs moléculaires et/ou par le mécanisme de treadmilling hybride (Figure 10).

Le transport actif des MTs par des moteurs moléculaires a été montré dans les cellules neuronales, notamment par des dynéines (Wang and Brown, 2002 ; Ahmad et al., 1998 ; He et al., 2005). Dans ces cellules, des kinésines sont également impliquées dans ce transport. Certaines kinésines marchent vers l'extrémité (-) des MTs comme CHO2/HSET (kinésines-14). Ces dernières sont impliquées dans la translocation des MTs dans les dendrites (Yu et al.,

2000). Chez *S. pombe*, Klp2 (kinésine-14) est impliquée dans l'organisation et le maintien de la polarité des faisceaux de MTs (Carazo-salas et al., 2005 ; Janson et al., 2007).

Dans les cellules de plantes, le transport des MTs s'effectue par le mécanisme de treadmilling hybride (Shaw et al., 2003).

iii. La capture et le co-alignement des MTs

L'activité de moteurs moléculaires ou le mécanisme du treadmilling hybride permettent aux MTs d'être transportés dans le cytoplasme afin d'atteindre la zone où le réseau acentrosomal de MTs va s'organiser. Ensuite, deux mécanismes non mutuellement exclusifs vont pouvoir prendre place : les MTs vont se co-aligner entre eux et s'organiser en faisceaux, ou vont être capturé à la membrane ou par des organites par l'activité de protéines localisées à l'extrémité (+) des MTs (+TIPs protéines).

1. Le co-alignement

Le co-alignement de MTs pour former des réseaux de faisceaux a surtout été observé dans les cellules de plantes (pour revue, Wasteneys et Ambrose, 2007). En effet, dans ces cellules, il est possible d'observer la dynamique des MTs dans des tissus (Shaw et al., 2003). Ainsi, en imagerie cellulaire, il a été observé que l'organisation du réseau cortical de MTs est dépendante de rencontres entre MTs mobiles et MTs plus stables (résidents). Le devenir du MT mobile va dépendre de l'angle avec lequel il va rencontrer un MT résident : si l'angle de rencontre est égal ou inférieur à 40°, le MT mobile peut se co-aligner avec le MT résident pour former un faisceau (Shaw et al., 2003, Dixit et Cyr 2004). Si l'angle est supérieur à 40°, le MT mobile peut se dépolymériser (touch and run), se casser ou encore croiser le MT résident (Shaw et al., 2003, Dixit et Cyr 2004 ; Wigthman et Turner, 2007) (Figure 10). Dans les cellules animales, il n'existe, à notre connaissance, aucune donnée analysant des évènements de rencontre entre MTs mobiles et résidents.

Pour générer des faisceaux de MTs, plusieurs protéines ont été décrites, comme par exemple les protéines tau, MAP1, MAP2 dans les cellules neuronales ou les protéines de la famille des MAP65s dans diverses cellules eucaryotes (PRC1 chez les animaux, Ase1 chez la levure, MAP65-1 chez les plantes). Cependant, dans les cellules animales, aucune localisation de PRC1 n'a encore été décrite en interphase.

2. La capture

Des protéines d'extrémité (+) de MTs comme EB1, APC ou encore CLASP semblent être impliquées dans la capture des MTs aussi bien dans les cellules animales que dans les cellules de plantes (Bartolini et al., 2006 ; Waysteneys et al., 2009 ; Pastuglia et al., 2007 ; Forges et al., 2012). La capture au cortex cellulaire des MTs a été décrite chez *S. pombe*. De nombreuses +TIPs (par exemple : tip1p l'orthologue de CLIP-170 et mal3p l'orthologue d'EB1) sont essentielles à la régulation de la dynamique des MTs qui vont atteindre le cortex cellulaire et interagir avec certaines protéines corticales (Chang, 2001 ; Chang et al., 2003 ; Hayles et al., 2001). Dans les cellules épithéliales de mammifère, APC et EB1 semblent être impliquées dans l'ancrage cortical des MTs (Reilein and Nelson, 2005; Reilein et al., 2005) et la névine (une -TIPs) est impliquée dans le recrutement des extrémités (-) de MTs au niveau du cortex apical (Lechler and Fuchs 2007). La capture latérale corticale des MTs a également été observée chez les cellules de plantes, notamment par p90/PLD qui est une enzyme interagissant avec les MTs et la membrane (Gardiner et al., 2001 ; Gardiner et al 2003 ; Marc et al., 1996). La protéine CLASP a également été montrée chez la plante comme ayant une implication dans l'interaction des MTs avec la membrane, l'inhibition de CLASP provoquant un détachement des MTs du cortex (Ambrose et al., 2008)(Figure 10).

Ce comportement de capture cortical des MTs permet une relocalisation et une stabilisation des MTs pour former un nouveau réseau acentrosomal. Ce dernier va ainsi se polariser et réorganiser le cytosquelette de la cellule.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé plus particulièrement aux mécanismes moléculaires qui permettent la mise en place et le maintien de réseaux composés de faisceaux de MTs anti-parallèles, en particulier dans les cellules de plantes. Plusieurs acteurs chez la plante et la levure sont impliqués comme les MAP65s (mentionnées ci-dessus) et des moteurs moléculaires tels que les kinésines de la famille-14.

III. Deux acteurs de l'auto-organisation des réseaux anti-parallèles de MTs

a. Les MAP65s

Les MAP65s constituent une famille de protéines conservées chez tous les eucaryotes. Des études biochimiques ont permis l'identification de ces protéines pour la première fois à partir de cellules de tabac BY-2 (Jiang et al., 1993). Elles ont un poids moléculaire d'environ 65 kDa et organisent collectivement les MTs en faisceaux *in vitro*. Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, 9 membres sont présents (Hussey et al., 2002) dont MAP65-1 qui induit la formation de faisceaux de MTs *in vitro* et se co-localise *in vivo* avec les MTs corticaux et les MTs de la midzone en anaphase (Smertenko et al., 2004, Van Damme et al., 2004 ; Gaillard et al., 2008). Des homologues de MAP65-1 ont été identifiés chez la levure (Ase1) et les cellules animales (PRC1) comme étant des protéines uniques et spécifiques de la midzone du fuseau mitotique (Pellman et al., 1995 ; Jiang et al., 1998 ; Mollinari et al., 2002).

Plus récemment, des homologues des MAP65s ont été découverts chez *C. elegans* et la drosophile, SPD-1 (Spindle-defective 1) et Feo (Fascetto) respectivement. Ces MAP65s sont toutes deux impliquées dans la cytokinèse (Verbrugghe et al., 2004 ; Verni et al., 2004). La perte de fonction des MAP65s dans ces organismes ainsi que chez les levures et les cellules de mammifères induit la déstabilisation du réseau de MTs anti-parallèles de la midzone avec une orientation aberrante des MTs du fuseau mitotique. Ce phénotype conduit à un défaut de la ségrégation des chromosomes et de la cytokinèse (Schuler et al., 2003 ; Pellman et al., 1995 ; Jiang et al., 1998 ; Mollinari et al., 2002 ; Verbrugghe et al., 2004 ; Verni et al., 2004 ; Yamashita et al., 2005).

i. Les membres de la famille des MAP65s chez les plantes

Un fait intéressant chez les plantes est que, contrairement aux autres cellules eucaryotes où les MAP65s sont uniques, il existe de nombreux gènes codant pour les MAP65s (Hussey et al., 2002). Comme mentionnés ci-dessus, 9 membres ont été identifiés chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Hussey et al., 2002 ; Sasabe et al (2006) ; pour revue Takahiro Hamada, 2007). MAP65-1 qui est l'orthologue de PRC1 et Ase1 est la mieux décrite à ce jour. Elle se localise avec les MTs corticaux en interphase et la midzone en anaphase. Elle induit *in vitro* la formation de faisceaux de MTs de polarité opposée (Gaillard et al., 2008). MAP65-2 induit la formation de faisceaux de MTs *in vitro* (Li et al., 2009) et est localisée avec tous les MTs corticaux *in vivo* où elle semble avoir un rôle comparable à

MAP65-1 suggérant une redondance dans leur fonctions (Lucas et Shaw, 2011). MAP65-3 est localisée avec les extrémités (+) des MTs du phragmoplaste en cytokinèse (Ho et al., 2012). MAP65-4 est localisée aux fibres kinétochoriennes en mitose (Fache et al., 2010). *In vitro*, MAP65-4 organise les MTs en faisceaux, sans polarité préférentielle, et génère une distance entre les MTs d'environ 15 nm. Elle forme un angle d'environ 90° par rapport à la lattice du MT (Fache et al., 2010), (Figure 11). MAP65-5 se lie aux MTs corticaux en interphase, avec le PPB et les MTs localisés autour du noyau en G2 et avec les MTs interdigités de la midzone (Van Damme et al., 2004). MAP65-5 organise *in vitro* les MTs en faisceaux de façon très similaire à MAP65-1 (Gaillard et al., 2008). MAP65-6 a été décrite comme localisée avec les mitochondries par Mao et al., (2005) et avec le fuseau mitotique en anaphase par Smertenko et al., (2008).

ii. Leurs propriétés

MAP65/PRC1/Ase1 possèdent un motif conservé chez tous les organismes (Schuyer et al., 2003) d'approximativement 16 acides aminés dans leur domaine de liaison aux MTs (MBD) qui est localisé à leur extrémité C-terminale, ainsi qu'un domaine central et N-terminale coil-coil déstructuré qui permet à la protéine de s'homodimériser. En solution, MAP65-1 est monomérique (Gaillard et al., 2008 ; Tulin et al., 2012), alors qu'Ase1 et PRC1 sont dimériques (Kapitein et al., 2008 ; Mollinari et al., 2002 ; Subramanian et al., 2010). Gaillard et al (2008) ont suggéré que MAP65-1 s'oligomériser lorsqu'elle est localisée le long de deux MTs adjacents pour les ponter.

MAP65-1/PRC1/Ase1 induisent la formation de faisceaux de MTs qui sont essentiellement de polarité opposée (Janson et al., 2007 ; Gaillard et al., 2008 ; Subramanian et al., 2010 ; Tulin et al., 2012). MAP65-1 et PRC1 forment des ponts entre les MTs de 25 à 30 nm, qui sont orientés avec un angle d'environ 60° par rapport à la lattice du MT (Gaillard et al., 2008 ; Subramanian et al., 2010) (Figure 11). En ce qui concerne la distance entre les MTs dans les faisceaux générés par Ase1 peu de données existent et les images réalisées au laboratoire montrent une distance d'environ 6 nm. L'orientation des ponts générés par Ase1 entre les MTs reste à être identifiée. *In vivo*, la distance entre les MTs organisés en faisceaux et co-localisés avec Ase1 est de l'ordre de 25 à 30 nm (Roque et al., 2010). Les faisceaux de MTs générés par les MAP65-1/-4 et PRC1 sont relativement stables lorsqu'ils sont exposés au froid ou à des drogues qui dépolymérisent les MTs (Wicker-Planquart et al., 2004 ; Mollinari et al 2002 ; Van Damme et al., 2004).

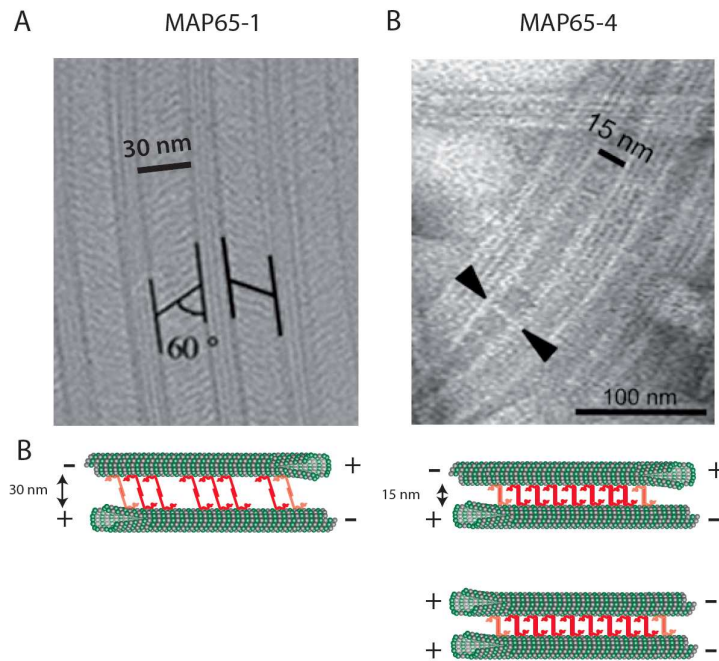


Figure 11 : La structure et la polarité des faisceaux de MTs organisés par les MAP65-1 et MAP65-4 d'*Arabidopsis*. (A) Image de cryo-microscopie électronique d'un faisceau de MTs organisé par la MAP65-1. Les MTs sont distants l'un par rapport à l'autre de 30 nm et la MAP forme un angle d'environ 60° par rapport à la lattice du MT. (B) Image de cryo-microscopie électronique d'un faisceau de MTs organisé par la MAP65-4. La distance entre deux MTs est d'environ 15 nm, et la MAP est orientée perpendiculairement par rapport à la lattice du MTs (adapté de Gaillard et al., 2008 et Fache et al., 2012). (C) Schéma représentant l'organisation d'un faisceau composé de deux MTs, en présence de la MAP65-1 (schéma de gauche) et de la MAP65-4 (schéma de droite), lorsque ceux-ci sont anti-parallèles (schémas du haut) ou parallèles (schémas du bas).

Il a été récemment décrit que MAP65-1/PRC1/Ase1 peuvent diffuser le long de la lattice de MTs individuels et former des multimères (Tulin et al., 2012 ; Kapitein et al., 2008 ; Subramanian et al., 2010) (Figure 12). Ces dimères/multimères ont une persistance plus grande entre deux MTs (en faisceaux) que sur des MTs individuels (Figure 12).

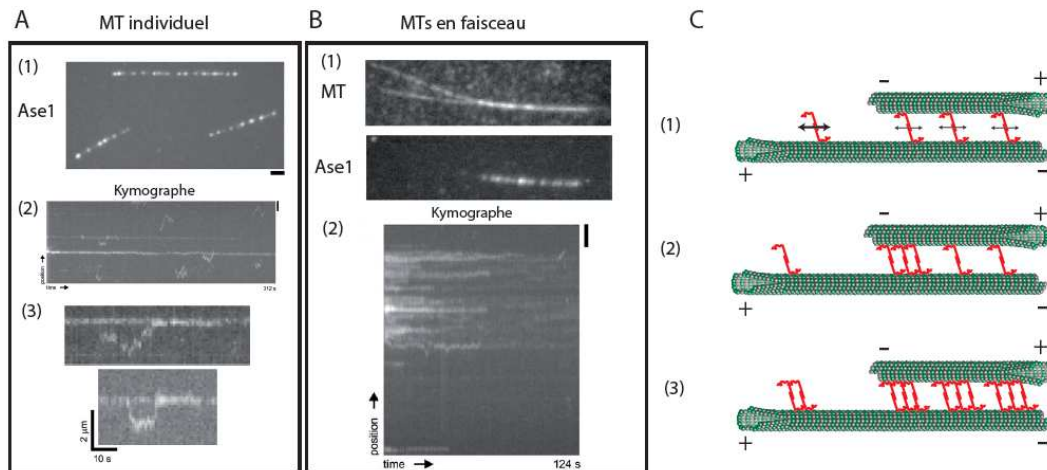


Figure 12 : (A) Observation d'Ase1-GFP localisée sur un MT individuel (1), formant des multimères très fluorescents et immobiles. (2) Kymographe d'un MT individuel en présence d'Ase1-GFP montrant des évènements de multimérisation de dimères d'Ase1-GFP. (3) Zoom du kymographe sur les évènements de multimérisation. (B) Images d'un faisceau constitué de deux MTs (1) avec les MTs marqués à la rhodamine (image du haut) et Ase1-GFP (image du bas). (2) Kymographe montrant la dynamique des multimères d'Ase1-GFP entre deux MTs en faisceaux. (C) Schéma illustrant le comportement de multimérisation d'Ase1. (1) les dimères d'Ase1 diffusent et se détachent plus rapidement des MTs individuels que lorsque localisés entre deux MTs (2-3). En diffusant, les dimères d'Ase1 vont former des multimères plus stables. A de faibles concentrations d'Ase1, la multimérisation ne se produit qu'entre les faisceaux de MTs (Adapté de Kapitein et al., 2008).

A partir d'essais *in vitro*, il a été montré que des MTs en croissance, lorsqu'ils se rencontrent à des angles compris entre 0° et 40° et avec des polarités opposées se co-alignent en présence de MAP65-1 et d'Ase1 (Janson et al., 2007 ; Tulin et al., 2012). L'hypothèse proposée pour expliquer le co-alignement des MTs à des angles élevés repose sur la flexibilité de domaine de projection (domaine d'oligomérisation de la partie N-terminale). Ce domaine est apparenté à une corde flexible par Subramanian et al. (2010). La flexibilité de ce domaine permettrait d'explorer un espace plus grand et donc d'augmenter la probabilité de rencontrer une autre MAP65 localisée sur un MT adjacent. Selon cette hypothèse, plus la longueur de la corde est grande, plus la probabilité d'homodimérisation à des angles élevés sera importante (Tulin et al., 2012).

Une fois que les MTs sont organisés en faisceaux par ces MAP65s, leur comportement dynamique semble être affectée. En effet, une étude récente en cours de publication au sein de notre laboratoire et à laquelle j'ai participé (Stoppin-Mellet et al., soumis, voir en annexe) a montré que les MAP65-1 et MAP65-4 modifient le comportement dynamique des MTs lorsqu'ils sont organisés en faisceaux. En présence de ces MAPs, la fréquence de catastrophe est limitée et la fréquence de sauvetage des MTs est augmentée. Il en résulte une persistance de l'élongation plus grande des MTs au sein du faisceau. Ces effets ne sont pas observés lorsque les MAP65s sont associées à des MTs individuels. Dans les faisceaux, les vitesses

d'élongation et de raccourcissement des MTs à leurs deux extrémités ne sont pas modifiées. La croissance d'un faisceau est donc dépendante de la polarité des MTs qui le constitue. Les faisceaux de MTs parallèles vont s'allonger à une vitesse maximale par rapport à l'élongation de l'extrémité (+) des MTs, alors que les faisceaux de MTs anti-parallèles vont être limités par la vitesse de polymérisation de l'extrémité (-) des MTs. Ainsi, les faisceaux dont les MTs sont majoritairement anti-parallèles (MAP65-1) sont plus courts que ceux composés de MTs de polarités mixtes (MAP65-4). Ces résultats révèlent également une coordination de l'élongation des MTs au sein d'un faisceau induit par ces MAP65s qui est due à l'augmentation de la fréquence des événements de sauvetage.

iii. Les mécanismes de régulation de MAP65 in vivo

In vivo l'activité de PRC1 est régulée par sa phosphorylation par CDK. Sa phosphorylation inhibe son activité de pontage, alors que sa déphosphorylation va permettre l'interdigitation des MTs au niveau de la midzone (Zhu et al., 2006). Cette phosphorylation permet également de contrôler l'interaction entre PRC1 et d'autres protéines de la midzone comme la kinésine Kif4 (Kurasawa et al., 2004). La phosphorylation de MAP65-1 par CDK n'affecte pas la progression du cycle cellulaire, mais semble avoir une régulation temporelle sur sa localisation au niveau du phragmoplaste en cytokinèse (Mao et al., 2005). L'inhibition de l'activité de MAP65-1 semble être induite par la phosphorylation par MAPK. L'absence de phosphorylation de MAP65-1 par MAPK conduit à un arrêt de l'expansion du phragmoplaste dû à une stabilisation constante des MTs (Nishirama et al., 2001). Pour Ase1, une étude récente a permis de montrer que sa phosphorylation par CDK chez *S. pombe* permet l'assemblage et la stabilisation du fuseau mitotique (Juanes et al., 2011). Récemment, il a été également montré dans notre laboratoire que MAP65-1 est phosphorylée *in vitro* par les Aurora kinases 1 et 2 d'*Arabidopsis* dans la partie C-terminale de la protéine (deux thréonines sont également phosphorylées par les deux kinases). Les effets de cette phosphorylation sur le comportement dynamique des MTs sont en cours d'étude au sein du laboratoire.

b. Les kinésines-14

Comme je l'ai mentionné précédemment dans cette introduction, les moteurs moléculaires jouent un rôle important dans l'organisation des réseaux de MTs en faisceaux. Les kinésines de la famille 14 sont particulièrement intéressantes de part leur implication dans de nombreux processus cellulaires. Parmi les moteurs moléculaires de cette famille, on trouve

Klp2 chez la levure, Ncd chez la drosophile, HSET chez les mammifères et ATK5 chez les plantes (Janson et al., 2007 ; Goshima et al., 2005 ; Cai et al., 2009 ; Ambrose et al., 2005). Elles possèdent un domaine moteur en position C-terminale qui marche vers l'extrémité (-) du MT. Elles ont également un deuxième site de liaison aux MTs en position N-terminale qui leur permet de ponter et de faire glisser les MTs entre eux (Walczak et al., 1997 ; Narasimhulu et al., 1998 ; Matulienė et al., 1999 ; Karabay et al., 1999).

L'activité motrice de ces moteurs joue un rôle dans l'organisation du fuseau mitotique et méiotique. Elle permet la focalisation des MTs parallèles aux pôles du fuseau (exemple : fibres kinétochoriennes), et l'organisation au centre du fuseau (Goshima et al., 2005). Par exemple, leur mutation dans différents types cellulaires révèle un défaut dans la focalisation du fuseau mitotique et méiotique (Endow et al., 1994; Matthies et al., 1996 ; Mountain et al., 1999 ; Ambrose et al., 2005), et également dans l'organisation de la midzone (Skowronek et al., 2007 ; Fink et al., 2009 ; Ambrose et al., 2005) .

Des études *in vivo* ont montré que les kinésines-14 sont localisées à l'extrémité (+) des MTs (Ambrose et al., 2005 ; Janson et al., 2007, Goshima et al., 2005). Cette localisation atypique d'un moteur moléculaire marchant vers l'extrémité (-) des MTs pourrait être due à l'interaction directe du domaine non moteur avec l'extrémité (+) du MT, ou à l'interaction avec une +TIPs (Figure 13). On remarque en effet une corrélation entre l'inhibition d'EB1 dans des cellules de drosophile et la perte de la localisation de Ncd à l'extrémité des MTs (Goshima et al., 2005). L'inhibition de l'activité de kinésines-14 dans des cellules animales conduit à l'assemblage de fuseaux mitotiques plus longs durant la transition entre la métaphase et l'anaphase A (Troxell et al., 2001 ; Brust-Mascher et al., 2002). Ces données suggèrent que ces kinésines pourraient avoir un rôle dans la régulation de la longueur du fuseau. A l'inverse, lorsque l'on supprime les kinésines-5, qui sont des kinésines qui marchent vers l'extrémité (+) des MTs (permettant également le glissement antiparallèle des MTs), (Kapitein et al., 2005), le fuseau s'effondre sur lui-même (Sharp et al., 1999 ; Mountain et al., 1999 ; Hoyt et al., 1993). Lorsqu'on inhibe par la suite les kinésines-14, on observe un rétablissement du phénotype sauvage. Ces études montrent que ces deux moteurs exercent des forces antagonistes sein du fuseau mitotique.

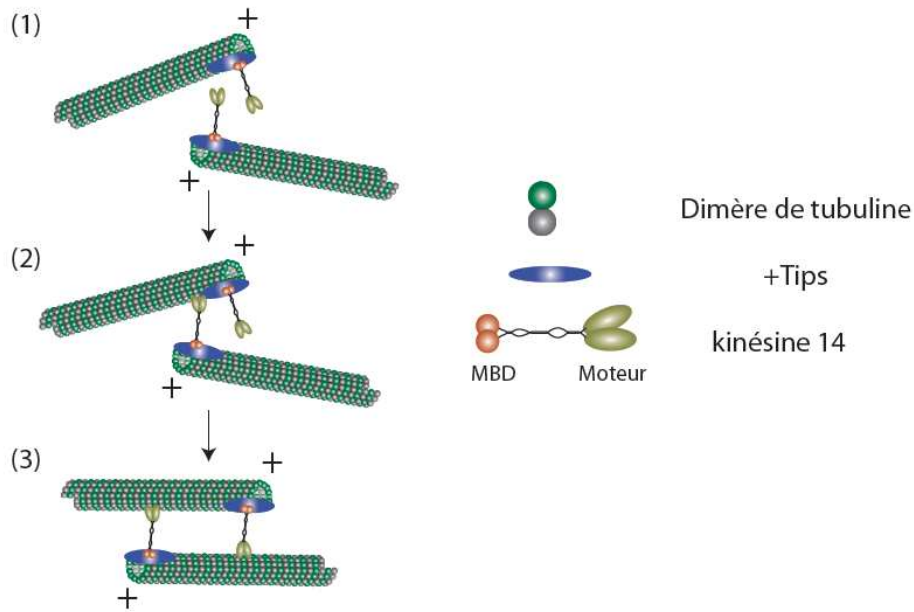


Figure 13 : Hypothèse du fonctionnement de co-alignement de MTs par ATK5 et de sa localisation à l'extrémité (+) des MTs. ATK5 *in vivo* est localisé à l'extrémité (+) des MTs au niveau de la zone d'interdigitation des MTs entre les deux asters. ATK5 pourrait être recruté aux extrémités (+) des MTs par un complexe de protéines +Tips ou par une interaction directe avec le MT (1). ATK5 pourrait permettre le co-alignement anti-parallèle des MTs (2) par son activité moteur, et par la suite permettre leur translocation (3), (Adapté de Ambrose et al., 2005).

i. Leurs propriétés

Des études récentes *in vitro* suggèrent que les kinésines-14, Klp2 et Ncd ne sont pas processives sur des MTs individuels, mais qu'elles peuvent diffuser sur la lattice des MTs par leur domaine non-moteur localisé en position N-Terminale (Fink et al., 2009 ; Braun et al., 2009). Le domaine de liaison aux MTs a une plus grande affinité pour la lattice du MT que le domaine moteur (Brawn et al., 2009). Ces kinésines vont donc s'attacher à la lattice du MT *via* le domaine non moteur, puis lorsque deux MTs se rencontrent, les têtes motrices vont faire glisser les MTs entre eux en se dirigeant vers l'extrémité (-). Lorsque les deux MTs sont en faisceaux anti-parallèles, les kinésines attachées sur chaque MT vont agir de concert pour faire glisser les MTs dans des directions opposées. Cependant si les deux MTs ont la même polarité, alors la balance des forces exercées par les deux populations de kinésines va bloquer la translocation des MTs formant ainsi un faisceau stable (Figure 14) (Brawn et al., 2009 ; Fink et al., 2009).

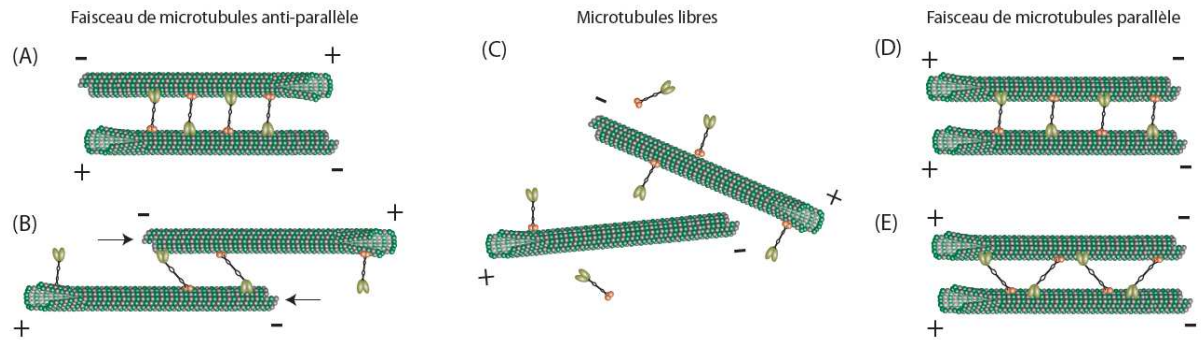


Figure 14 : Modèle de balance des forces entre MTs en présence de kinésine-14. (A-E) Klp2 peut diffuser librement en solution et s'attacher à un MT par son domaine moteur ou son domaine de liaison aux MTs. Le moteur peut ensuite établir un pont latéral aléatoirement entre des MTs (D) parallèles ou (A) anti-parallèles. Klp2 permet le glissement de deux MTs anti-parallèles (A-B) l'un par rapport à l'autre, jusqu'à la totale dissociation des MTs (C). Au contraire, la liaison entre deux MTs parallèles induit la formation de faisceaux de MTs stables (D-E), piégés dans une balance de forces générées par deux populations de moteurs moléculaires tirant les MTs dans la même direction (Adapté de Braun et al., 2009).

Ces kinésines vont pouvoir jouer plusieurs rôles dans l'organisation des réseaux de MTs. Elles vont à la fois transporter des MTs de polarités opposées et stabiliser des faisceaux de MTs de même polarité. Ces propriétés permettent l'auto-organisation de MTs en aster avec l'extrémité (-) des MTs focalisées au centre de l'aster (Surrey et al., 2001). Dans la cellule ces kinésines-14 semblent jouer un rôle dans la focalisation des MTs aux pôles du fuseau à la fois en méiose et en mitose. Ce mécanisme permet la focalisation des fibres kinétochoriennes qui sont déconnectées du MTOC (Goshima et al., 2005 ; Endow et al., 1994 ; Mountain et al., 1999) pour former et maintenir le fuseau bipolaire (Walczak et al., 1998). Ainsi, en mitose, Klp2 localisée aux extrémité (+) des MTs connectés aux centrosomes, permet la recherche et la capture des fibres kinétochoriennes ainsi que leur transport pour former le fuseau bipolaire (Goshima et al., 2005).

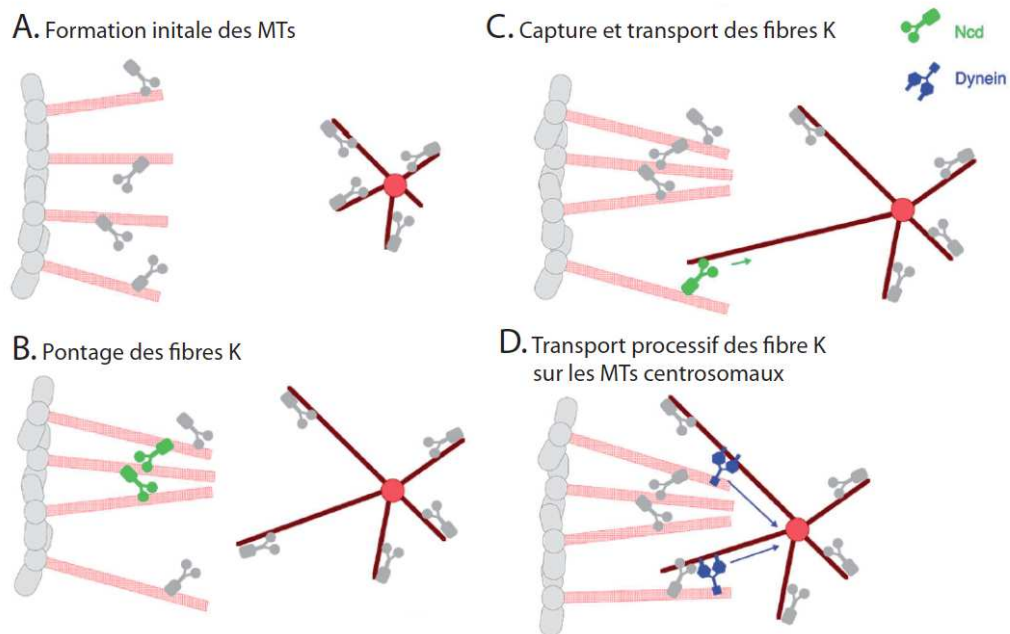


Figure 15 : Modèle en trois étapes de la focalisation des pôles par des moteurs d'extrémité (-). (A) pendant le processus d'assemblage du fuseau durant le début de la mitose, ou même durant la métaphase quand la longueur du fuseau bipolaire est stable, les microtubules centrosomaux et les faisceaux de MTs du kinétochore (fibre K) sont souvent discontinus. (B) Alignement des fibres Kinétochoriennes entre elles par les moteurs moléculaires. (C) « Recherche et Capture » des fibres kinétochoriennes par Ncd, qui est recruté à l'extrémité (+) des MTs. (D) les moteurs moléculaires (principalement des dynéines) vont transporter les fibres Kinétochoriennes sur les MTs centrosomaux jusqu'au pôles (Adapté de Goshima et al., 2005).

c. L'organisation des MTs : les MAP65s et les Kinésines-14

Plusieurs études *in vivo* ont présenté le rôle d'Ase1 et de Klp2 dans l'auto-organisation de réseaux de MTs bipolaires (Janson et al., 2007 ; Carazo-salas et al., 2006). Janson et al., (2007) expliquent que l'organisation du réseau de MTs en interphase chez *S. pombe* est principalement due à l'action de Klp2 : Klp2 transporte les MTs nouvellement nucléés vers l'extrémité (-) d'un MT pré-existant. Ce mécanisme va permettre de densifier la zone de chevauchement du faisceau de MTs en localisant les extrémités (-) des MTs au centre du faisceau. Klp2 qui est localisée à l'extrémité (+) du MT, va ainsi transporter le MT de manière indépendante de la longueur du MT. En parallèle, Ase1 va s'accumuler au sein de ces faisceaux de MT anti-polaire et va freiner l'action de Klp2 (Brawn et al., 2011). Brawn et al., (2011) décrivent un effet de « balayage » d'Ase1 entre deux MTs glissant l'un par rapport à l'autre qui a pour effet l'enrichissement d'Ase1 dans la zone de chevauchement des deux MTs au fur et à mesure que celle-ci se réduit (Figure 15). Cet effet « balayage » est possible grâce à la capacité de diffusion d'Ase1 le long des MTs, à sa forte affinité et ainsi qu'à sa persistance dans les zones d'interdigitation des MTs (Kapitein et al., 2008). Ce mécanisme permettrait de maintenir une zone stable de chevauchement entre les MTs : plus elle se réduit à cause du glissements des MTs et plus Ase1 s'y concentre et agit comme un frein pour réduire l'activité de kinésines-14.

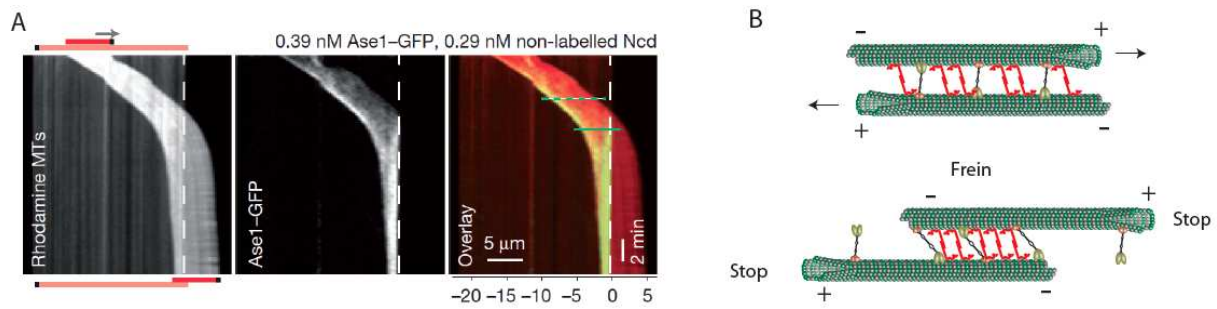


Figure 15 : Ase1 permet la constitution d'une zone de chevauchement stable entre les MTs en présence d'une kinésine-14. (A) Kymographe montrant le ralentissement du glissement d'un MT par la kinésine Ncd : la translocation d'un des deux MTs est identifiée par un marquage rhodamine du MT (image de gauche) et la localisation d'Ase1-GFP entre les MTs qui se chevauchent par un marquage GFP (Image du milieu). On peut distinguer une accumulation d'Ase1-GFP au niveau de la zone de chevauchement des MTs qui se rétrécit par le glissement du MT induit par la kinésine. (B) Schéma représentant la formation d'une zone de chevauchement de MTs en présence de la kinésine d'extrémité (-), Ncd et d'Ase1. Lorsque Ncd fait glisser les MTs entre eux, Ase1, qui a une affinité plus grande pour la zone de chevauchement des MTs que pour les MTs individuels va se compacter et freiner progressivement la translocation des MTs jusqu'à l'arrêter totalement (Adapté de Braun et al., 2011).

L'espace spécifique entre les MTs dans un faisceau organisé par Ase1/PRC1 et leur polarité préférentiellement anti-parallèle permettrait également le recrutement de différentes protéines clés de la midzone dont certaines kinésines (Gruneberg et al., 2006 ; Kurasawa et al., 2004 ; Roque et al., 2010).

Parmi ces moteurs moléculaires on a également les kinésines de la famille 5 qui jouent un rôle majeur dans l'organisation des réseaux de MTs anti-parallèles (pour revue Peterman et al., 2009). Les kinésines-5 sont des moteurs moléculaires tétramériques qui se dirigent vers l'extrémité (+) des MTs, et qui génèrent des forces en opposition avec les kinésines-14 (Hentrich et al., 2010). Bieling et al., (2010) ont montré récemment l'interaction entre PRC1 et une kinésine 5 (Xklp1) *in vitro*, ces deux protéines agissant en synergie pour constituer une zone de chevauchement stable entre deux MTs anti-parallèles.

Toutes ces données ont permis d'établir un modèle sur les mécanismes permettant l'organisation et le maintien de la zone de chevauchement des MTs au sein du fuseau mitotique. Ase1 et Klp2 permettraient la constitution d'un réseau de MTs anti-parallèles (Janson et al., 2007). Klp2 permettrait l'orientation et l'organisation des MTs, et Ase1 induirait leur stabilisation et leur organisation anti-parallèle préférentielle. Ase1 serait également impliqué dans le recrutement d'une Kinésine-5 qui va contrebalancer les forces exercées par des kinésines-14 et permettre le maintien de la longueur du fuseau, ou si la

balance des forces est déséquilibrée, son élongation (Figure 16) (pour revue Peterman et al., 2009).

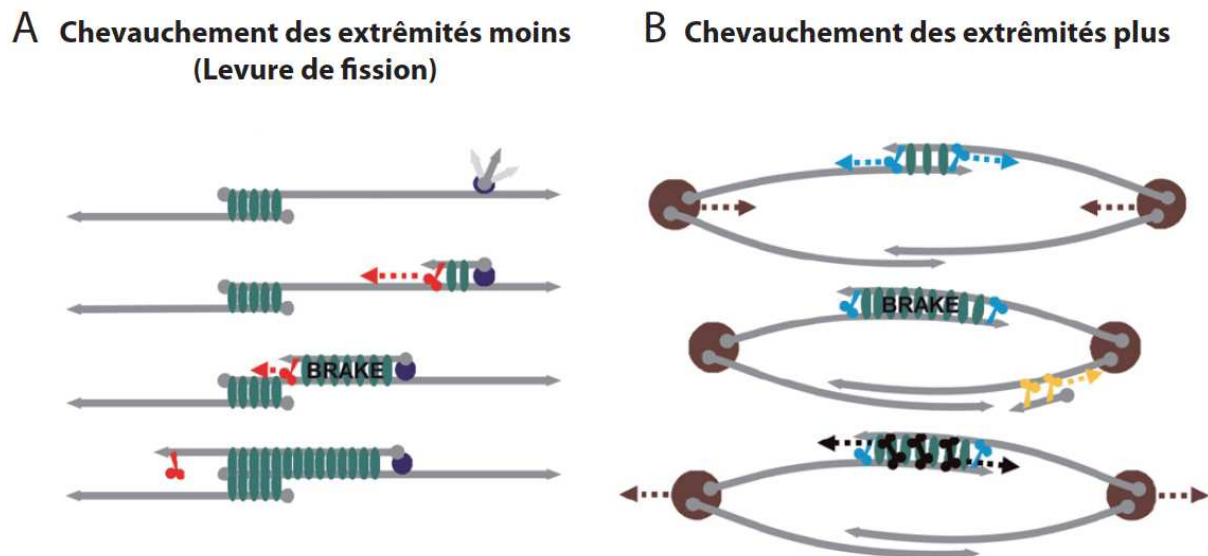


Figure 16 : Modèle d'organisation de MTs par compétition entre translocation et forces de friction. (A) Les extrémités (+) des MTs sont indiquées par des flèches et les extrémités (-) par des sphères. La nucléation des MTs s'effectue par des complexes de nucléation (violet) le long des faisceaux interphasiques. Après la nucléation, les MTs sont stabilisés dans une configuration anti-parallèle par Ase1 (vert). La kinésine Klp2 (rouge) va transporter les MTs vers le faisceau formant la midzone. Lorsqu'un nouveau MT s'allonge, un nombre plus important d'Ase1 va s'ajouter, augmentant alors la friction exercée sur des moteurs moléculaires localisés à l'extrémité (+) du MT et dont le nombre est indépendant de la longueur du MT. En conséquence, la vitesse de transport du MT est ralentie jusqu'à ce que le moteur perde le contact avec le MT antiparallèle. (B) Modèle de mécanismes possibles basés sur des forces dépendantes ou indépendantes de la longueur pour la régulation de la zone de chevauchement des extrémités (+) de MTs anti-parallèles. Les MTs anti-parallèles entre les deux asters sont organisés en faisceaux par Ase1 (vert), n'empêchant pas le transport de MTs de même polarité vers les pôles (jaunes). D'autres moteurs moléculaires d'extrémités (-) (bleu) peuvent s'attacher spécifiquement aux extrémités (+) des MTs et ainsi tirer les pôles l'un vers l'autre avec une force indépendante de la zone de chevauchement. Des moteurs se dirigeant vers l'extrémité (+) des MTs (noir) peuvent s'attacher le long des MTs en faisceaux. Ces moteurs induisent une force dépendante de la longueur de chevauchement entre les MTs qui repoussent les pôles l'un de l'autre. Un équilibre des forces peut exister entre les kinésines qui se dirigent vers l'extrémité (+) ou (-) des MTs et qui peuvent être régulées par Ase1 (Adapté de Janson et al., 2007).

IV. Les propriétés mécaniques des MTs

Comme nous l'avons vu précédemment les MTs ont un rôle essentiel dans la morphogénèse cellulaire. L'organisation des réseaux de MTs, le comportement des MTs et leur fonction dans la cellule ne sont pas influencés uniquement par l'action des MAPs mais également par la flexibilité de ces filaments. En effet, les MTs sont des filaments rigides qui peuvent avoir une longueur de persistance de 1 à 8 μm . Leur construction cylindrique leur assure une résistance contre les forces de compression qui contribue aux propriétés mécaniques et élastiques des cellules eucaryotes. En comparaison, ils sont beaucoup plus rigides que d'autres filaments du cytosquelette comme les filaments d'actine qui présentent une longueur de persistance comprise entre 10 et 20 μm (Gittes et al., 1993 ; Pfaendtner et al., 2010). La rigidité des MTs permet à la cellule de déformer sa membrane (sauf pour les cellules ayant des parois telles que les cellules de plantes ou les levures), ou d'assurer le transport intracellulaire sur de longues distances, et de rester stable face aux tensions intracellulaires exercées par le réseau d'actine ou à de larges « cargos » comme les chromosomes ou le noyau.

a. La flexibilité des MTs *in vitro*

De nombreux groupes, utilisant des approches expérimentales différentes, ont étudié la flexibilité des MTs. Deux types de mesures de la flexibilité des MTs sont rapportés dans la littérature : les approches passives qui n'exercent pas de force sur les MTs et des approches actives où des forces sont appliquées sur les extrémités ou sur toute la longueur des MTs (Figure 17).

i. Les différentes approches

1. Les approches passives

Les approches passives utilisent les fluctuations thermiques du milieu qui déforment le MT sur toute sa longueur ou sur une des extrémités du MT dont l'autre est fixe (Figure 17 B1). Cette méthode est plus facile à mettre en place qu'un dispositif expérimental qui consiste à exercer une force sur un MT. Elle a donné de bons résultats avec les filaments d'actines. Cependant les MTs étant beaucoup plus rigides et les courbures des MTs induites par les fluctuations thermiques étant très faibles, l'analyse de la flexibilité par ces approches est difficile.

2. Les approches actives

Les approches actives mettent en oeuvre divers dispositifs expérimentaux pour déformer les MTs (Figure 17 B2). On distingue l'utilisation de flux, de pièges optiques, de sondes de microscopie à force atomique, et de moteurs moléculaires. La force produite par la polymérisation des MTs peut également être utilisée afin d'étudier sa courbure en géométrie contrainte, par exemple en utilisant une barrière rigide ou une membrane (Figure 17 B3). Ces approches sont plus complexes à mettre en oeuvre que les approches passives mais permettent de sonder la rigidité des MTs en y appliquant directement une force connue.

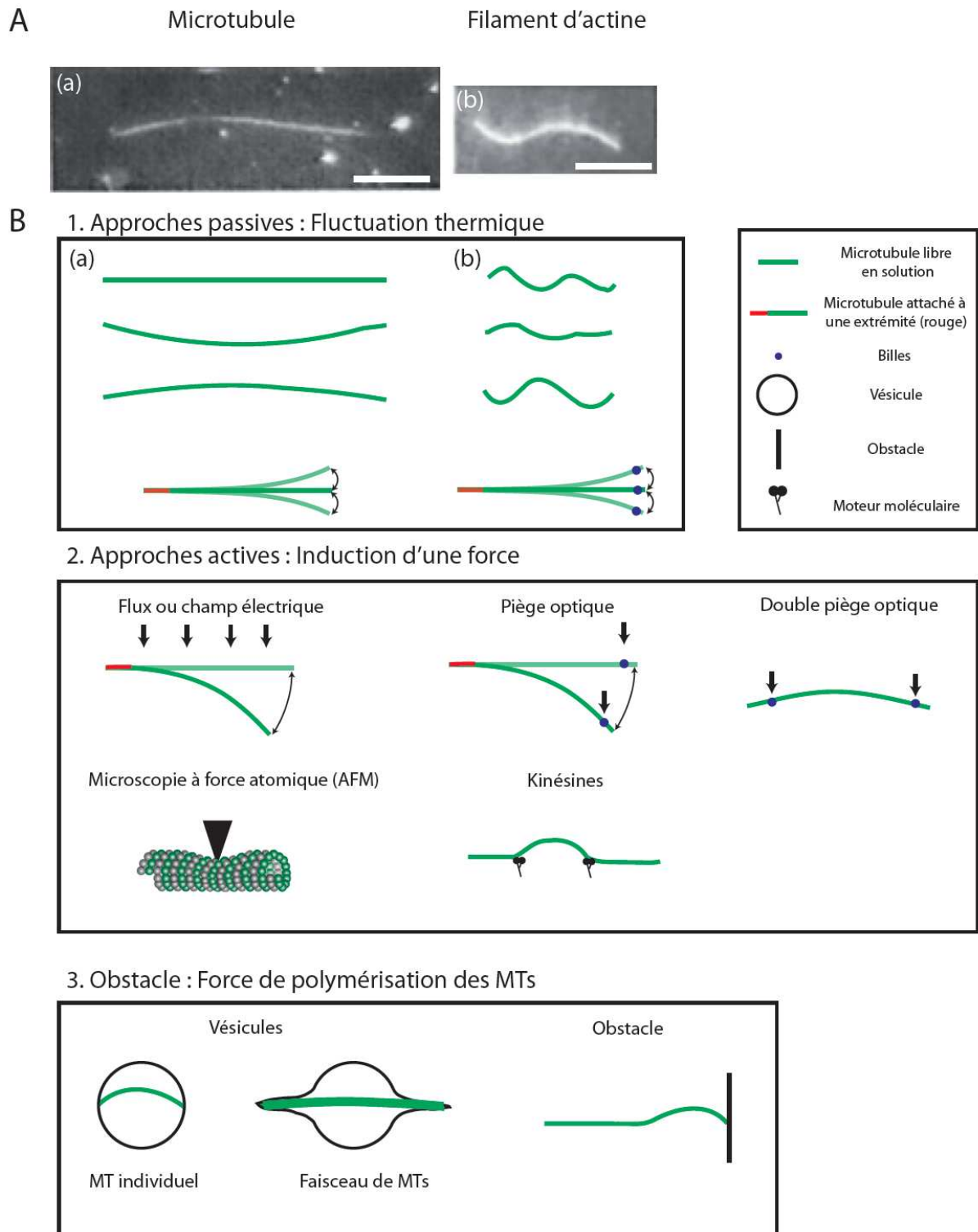


Figure 17 : Mesure de la flexibilité des MTs *in vitro*. (A) Images d'un MT (à gauche) et d'un filament d'actine (à droite) lors d'une expérience de fluctuation thermique (Gittes et al., 1993), échelle = 20 μm . (B) Schémas des différentes techniques de mesure de la flexibilité des MTs, (1) les approches dites « passives » où la seule force exercée sur le MT correspond à des fluctuations thermiques, (2) les approches dites « actives » où une force est exercée sur le MT : par un flux ou un champ électrique, par un piège optique, des moteurs moléculaires ou une sonde d'AFM, (3) une troisième approche consiste à utiliser la force produite par la polymérisation du MT qui se déforme dans un système en contrainte 3D (vésicule) ou 2D (mur de verre ou de PDMS).

La flexibilité d'un filament est souvent décrite sous la forme d'une rigidité de flexion (EI), où E est l'élasticité faisant référence au module de Young pour la flexion et I le moment d'inertie qui décrit les caractéristiques de l'objet (ici un cylindre). L'autre moyen de quantifier cette flexibilité est d'utiliser la longueur de persistance (L_p) qui est liée à la rigidité de flexion par l'énergie thermique du système : $L_p = EI/kbT$ (où K_b = constante de Boltzmann et T = à la température absolue en kelvin) (Landau et Lifshitz, 1986). Cette longueur de persistance est définie comme étant la longueur au delà de laquelle la corrélation dans la direction des tangentes est perdue (Figure 18).

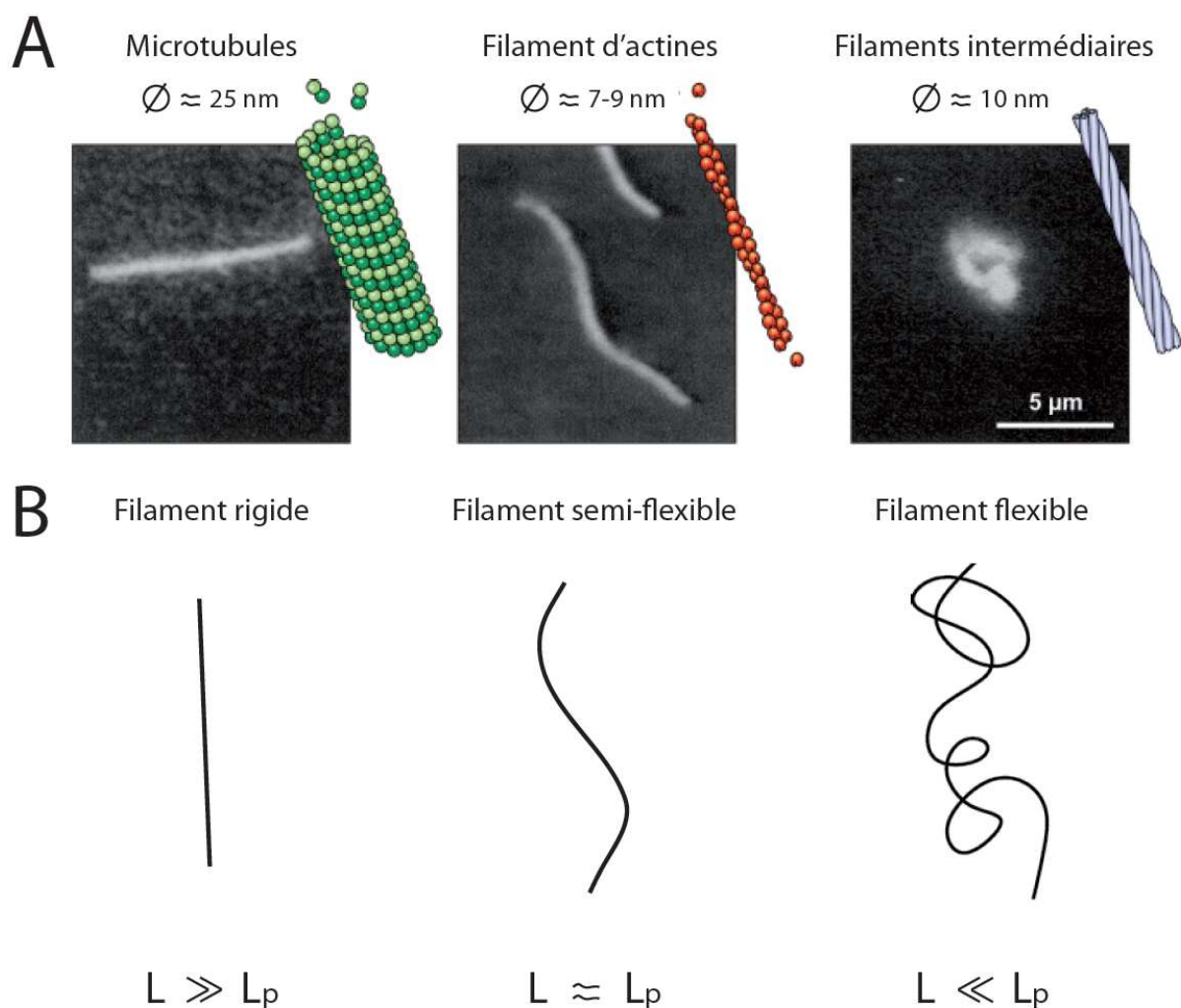


Figure 18 : (A) Images des trois principaux types de filaments constituant le cytosquelette : les MTs, les filaments d'actine et les filaments intermédiaires. Ces trois types de filaments peuvent être caractérisés par leur différence de rigidité. (B) Schéma représentant la flexibilité des filaments, pour les MTs, les filaments d'actine et les filaments intermédiaires (de gauche à droite), (Adapté de Liverpool et al., 2006).

Les différentes approches décrites jusqu'ici pour étudier la flexibilité des MTs n'ont

pas permis d'arriver à une conclusion définitive concernant la L_p des MTs. Selon les différentes études, elle peut varier de 1 à 8 mm (pour revue Hawkins, 2009). La variabilité des valeurs décrites dans la littérature peut s'expliquer par l'utilisation d'approches expérimentales très différentes et souligne nos connaissances encore faibles des propriétés mécaniques des MTs.

ii. L'effet des drogues sur la rigidité des MTs

Un des points de discorde dans la littérature est l'effet du taxol sur la flexibilité des MTs. Beaucoup d'études des propriétés mécaniques des MTs ont été réalisées en présence de taxol. En effet, la stabilisation des MTs par cette drogue facilite leur manipulation lors des expériences. La plupart des groupes sont d'accord sur le fait que le taxol induit une plus grande flexibilité des MTs (Dye et al., 1993 ; Venier et al., 1994 ; Felgner et al., 1996 ; Kikumoto et al., 2006), cependant deux groupes trouvent des résultats différents: soit aucun effet (Vale et al., 1994), soit une augmentation de la rigidité des MTs (Mickey et Howard, 1995). En parallèle des données expérimentales, certains modèles théoriques indiquent cependant que la stabilisation des MTs par le taxol pourraient rendre les MTs plus flexibles (VanBuren et al., 2005 ; Mitra et al., 2008).

iii. L'état nucléotidique de la tubuline

L'état nucléotidique de la tubuline joue un rôle important dans la modification de la flexibilité des MTs. La conformation des dimères de tubuline diffère selon qu'ils sont associés au GTP ou au GDP. Lorsqu'ils sont sous forme GTP, les protofilaments de tubuline ont une conformation plus « droite » que lorsqu'ils sont sous forme GDP (Elie-Caille et al., 2007). Cette propriété induirait une différence de flexibilité entre les MTs GDP et GTP. Afin de mimer l'état GTP de la tubuline de façon stable, le GMPCPP est fréquemment utilisé car il est un analogue non hydrolysable du GTP. Les résultats de plusieurs équipes ont ainsi confirmé que les MTs sous forme GDP seraient plus flexibles que les MTs sous forme GTP ou GMPCPP (Mickey et Howard, 1995 ; Kawaguchi, et al., 2010 ; Donhauser et al., 2010).

iv. L'effet de la température

Une étude de Kawaguchi et al. (2010) a montré qu'il existe une corrélation entre l'augmentation de la température et l'augmentation de la flexibilité des MTs. Selon les auteurs cette différence de la flexibilité peut être expliquée par l'état nucléotidique de la tubuline. L'hydrolyse du GTP est une réaction enzymatique, de ce fait elle est favorisée par une augmentation de la température. Les MTs obtiendraient plus rapidement une conformation GDP par l'hydrolyse du GTP après leur intégration dans la lattice des MTs et ces derniers deviendraient ainsi plus flexibles (Kawaguchi et al 2007 ; Kawaguchi et al., 2010).

v. *L'effet de la dynamique des MTs*

Janson et Dogterom (2004) émettent l'hypothèse selon laquelle une partie de la variabilité des mesures de la longueur de persistance des MTs mesurées *in vitro* serait due à l'historique de polymérisation du MT. Selon ces auteurs, la vitesse de polymérisation des MTs modifie leur flexibilité. Ils ont observé, par une approche passive de fluctuation thermique, une corrélation entre la vitesse de polymérisation des MTs et leur longueur de persistance (MTs en croissance et en absence de stabilisateur). Avec des vitesses de polymérisation entre 1,2 à 2,7 $\mu\text{m}/\text{min}$, ils obtiennent une différence d'un facteur 2 dans la L_p des MTs. Ainsi, plus la vitesse de polymérisation est élevée et plus la flexibilité des MTs est grande. Ils expliquent ce phénomène par l'apparition de défauts dans la lattice du MT lorsqu'il polymérise rapidement.

L'état dynamique du MT semble aussi jouer un rôle dans sa flexibilité. En effet, Keller et al. (2008) ont mesuré la L_p des MTs en fonction de leur état dynamique. Ils ont analysé la flexibilité de MTs nucléés à partir de centrosomes, en présence d'extraits de xénope et dans des chambres cylindriques transparentes en téflon. La L_p des MTs est calculée à partir de leur flexion lorsqu'ils rencontrent un mur de téflon. Leurs résultats indiquent que les MTs en phase d'élongation sont plus flexibles que les MTs en pause.

vi. *La structure anisotropique des MTs*

Une des observations la plus surprenante sur la flexibilité des MTs a été réalisée par Pampaloni et al. (2006). Les auteurs montrent que la rigidité des MTs dépend de leur longueur : plus les MTs sont courts et plus leur L_p est faible. Ces résultats ont été confirmés par la suite par d'autres groupes (Kurachi et al., 1995 ; Keller et al., 2008). Cette différence dans la flexibilité des MTs en fonction de leur longueur serait due à leur nature

anisotropique, à savoir la différence qu'il y a entre les liens longitudinaux et latéraux qui existent entre les dimères de tubuline. Les liens longitudinaux sont plus forts que les liens latéraux (exemple : lors de la dépolymérisation des MTs, les dimères de tubuline restent en partie sous forme de protofilaments et non en feuillets).

vii. L'effet des protéines associées aux MTs

Bien que les MAPs aient un rôle majeur dans la régulation de la dynamique des MTs et dans leur organisation en réseaux structurés, on connaît assez peu leurs effets sur la mécanique des MTs. Les MAPs les plus étudiées dans ce domaine sont les MAPs neurales tau et MAP2, qui augmentent toutes les deux la rigidité des MTs *in vitro* (Dye et al., 1993 ; Felgner et al., 1997 ; Mickey et Howard, 1995). Cependant certaines études ont mis en évidence une compétition de la liaison sur la lattice des MTs entre tau et le taxol (Kar et al., 2003 ; Samsonov et al., 2004), l'effet de tau sur la L_p des MTs doit être confirmé.

L'effet d'une autre MAP, la XMAP215, qui est une protéine de l'extrémité (+) des MTs, sur la mécanique de MTs dynamiques a été étudié mais aucun changement significatif de la rigidité des MTs n'a été observé en sa présence (Cassimeris et al., 2001).

b. La flexibilité des MTs in vivo

La grande rigidité des MTs, comparés aux autres polymères biologiques comme les filaments d'actines et les filaments intermédiaires, doit être utilisée par la cellule pour opérer différents processus (trafic intracellulaire, déformation de la membrane, séparation du matériel génétique, modification de sa forme, etc.). Cependant, la majorité des données obtenues jusqu'ici proviennent d'expérimentations *in vitro*. En effet, *in vivo*, la flexibilité des MTs est difficile à quantifier à cause nombreux facteurs tels que la force générée par les autres réseaux de filaments, la densité et la complexité de l'interaction entre les MTs et les protéines associées. Seules quelques études sur des MTs localisés à la périphérie des cellules ont permis d'observer des déformations de MTs individuels, suggérant une certaine « souplesse » de ces MTs (Figure 19A et 20A) (Brangwynne et al., 2006 ; Odde et al., 1999). Deux types de déformation ont été décrits : les déformations à basses fréquences et à hautes fréquences (Figure 19B et C). Les déformations à basses fréquences peuvent être dues à des forces de compression internes à la cellule et sont caractéristiques du flambage des MTs observés *in vitro* (Janson et Dogterom, 2007). Les hautes fréquences observées *in vivo* donnent une L_p apparente des MTs de l'ordre de $30 \mu\text{m}$, ce qui est largement inférieur à la

Lp observé *in vitro* (entre 1 et 8 mm).

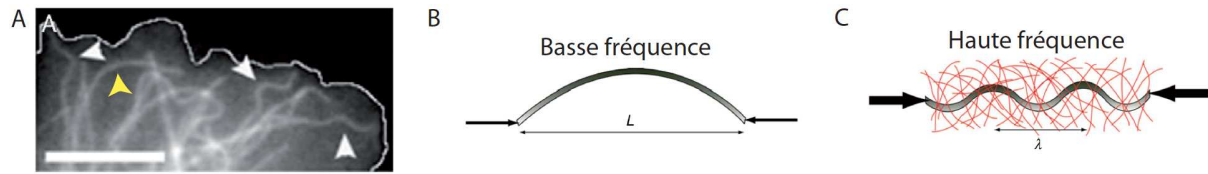


Figure 19 : (A) Image de MTs fluorescents à la périphérie d'une cellule adhérente (Echelle = 5 μ m). (B) Schéma d'un MT subissant une déformation dite de « basse fréquence » (Indiqué en (A) par une flèche jaune) et en (C) un MT subissant une déformation dite de « haute fréquence » (Indiqué en (A) par des flèches blanches).

Une des explications à l'heure actuelle serait que la contraction du réseau d'actine induirait des forces sur les MTs. Des fluctuations du milieu visco-élastique du cytoplasme pourraient réorienter les extrémités croissantes des MTs et induire des déformations hautes fréquences (Brangwynne et al., 2006) (Figure 20B (a)). Ces auteurs montrent également que pour qu'un MT d'une Lp d'environ 1 millimètre (mm) explore son environnement tel qu'observé *in vivo*, il faut augmenter d'un facteur 10 la force des fluctuations latérales exercé sur le MT. Cette différence peut être expliquée soit par la force exercée par le réseau d'actine, soit par une rigidité des MTs *in vivo* plus faible que celle mesurée *in vitro* (Figure 20 D). En effet lorsque l'on modélise un MT, on peut voir que si on diminue sa Lp on retrouve des déformations similaires à celles observées *in vivo* (Figure 20 C). Ces fortes déformations pourraient également être induites par des moteurs moléculaires (Bicek et al., 2009 ; Keating et al., 1997) (Figure 19B (b-c)).

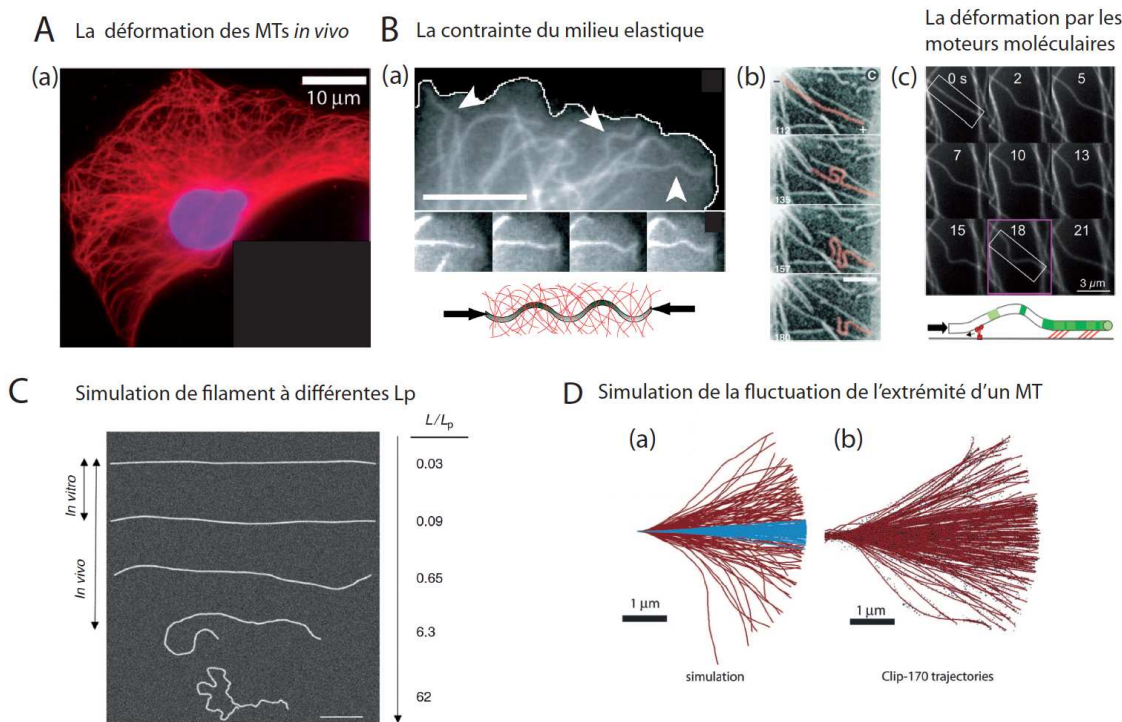


Figure 20 : Flexibilité des MTs *in vivo* versus *in vitro*. (A) (a) Image d'un réseau de MTs qui, montre l'existence de courbures des MTs. Cellule CHO où les MTs sont marqués en rouge et le noyau en bleu. B (a) Déformation de l'extrémité des MTs dans la périphérie de cellules Cos7 (adapté de Brangwynne et al., 2006). Ces auteurs ont développé une hypothèse selon laquelle les déformations importantes des MTs localisés à la périphérie de la cellule seraient générées par un renforcement mécanique du à la compression exercée par le cytosquelette environnant (échelle = 10 μm). (b) MTs nucléés au centrosome et relargués : au cours de leur transport, ces MTs subissent de fortes déformations (adapté de Keating et al., 1997) (échelle = 5 μm). (c) Images montrant la courbure de MTs dans des cellules LLC-PK1. D'après Bicek et al., (2009), cette déformation pourrait être due à la force exercée par un moteur moléculaire sur la lattice des MTs. (C) Exemples de simulations de MTs ayant un ratio L/L_p de 0,03 ; 0,09 ; 0,65 ; 6,3 ; 62 (du haut vers le bas). Les quatre premiers filaments ont une forme correspondant à celles retrouvées *in vivo*. Cependant *in vitro*, seule la forme de filaments correspondant aux deux premières images a été observée (adapté de Bicek et al., 2007). (Echelle = 5 μm). (D) Simulation de la trajectoire de MTs et données expérimentales. (a) Simulation : la région qu'un MTs (en bleu), d'une longueur de persistance d'environ 1 μm , peut explorer et, en rouge, lorsque l'on augmente d'un facteur 10 la force des fluctuations latérales. (b) Expérience : les trajectoires de MTs *in vivo* sont observées par un marquage de CLIP-170 à leur extrémité. Elles montrent que la région explorée par les MTs est similaire à celle simulée dans des conditions de fortes fluctuations latérales. Les auteurs émettent l'hypothèse que ces déformations sont dues au renforcement mécanique des MTs grâce au cytosquelette environnant et des forces actives non thermiques qui vont permettre ces fluctuations latérales (adapté de Brangwynne et al., 2007).

Les courbures des MTs pourraient également être associées à des protéines qui régulent leur flexibilité en fonction des contraintes mécaniques auxquelles ils sont soumis. Dans l'étude de Samsonov et al. (2004), les auteurs observent une accumulation de tau sur les zones fortement courbées des MTs et proposent que cette accumulation rendrait localement plus rigide la lattice des MTs pour leur permettre de mieux résister aux compressions auxquelles ils sont soumis. Dans cette même étude, l'expression de tau dans des fibroblastes a également montré que des faisceaux de MTs formés par tau provoquent un phénotype

dendritique. Ceci est dû à l'augmentation de la rigidité du réseau de MTs qui déforme la membrane et montre l'importance pour la cellule de réguler la rigidité de son réseau de MTs.

La génération de forces produites par la polymérisation des MTs (Janson et Dogterom, 2004) va jouer un rôle majeur dans la régulation géométrique de ces réseaux dans des espaces confinés 3D. Ainsi, Cosentino-Lagomarsino et al. (2007), pour étudier l'impact de la contrainte de confinement dans l'auto-organisation de MTs, ont observé la polymérisation de MTs dans des cuves ayant des dimensions comparables à celles de cellules de plantes BY2. Cette étude a été complétée par un modèle mécanique qui permet de décrire les paramètres impliqués dans l'auto-organisation des MTs observés expérimentalement. Ces auteurs constatent que les MTs polymérisés, dans ce système, sont trop rigides par rapport à la taille de la cellule qui est plus petite de 1 à 2 ordres de grandeur par rapport à la L_p d'un MT. De ce fait, les MTs vont s'organiser de manière à diminuer la contrainte générée par leur flexion. Au lieu de s'organiser transversalement par rapport à l'axe majeur d'élongation de la cellule, les MTs vont choisir de s'organiser parallèlement à son axe de croissance. L'hypothèse des auteurs est que dans les cellules de plantes d'autres facteurs doivent entrer en jeu pour contraindre les MTs dans une conformation transverse, comme l'activité de moteurs moléculaires, de protéines d'ancrage ou de protéines créant des ponts entre les MTs (formation de faisceaux).

Ces données montrent que la rigidité des MTs joue un rôle important dans leur capacité à s'auto-organiser en réseau. Une augmentation de la rigidité des MTs leur permettrait de résister aux forces de compression et de pouvoir déformer la membrane de la cellule. A l'inverse, une diminution de la rigidité des MTs serait en faveur d'un comportement de « recherche et capture » tel que décrit par Mitchison et kirschner (1985) et qui permettrait aux MTs, plus flexibles, d'explorer un volume cellulaire plus grand.

Jusqu'ici les données qui ont été décrites sur la flexibilité des MTs ont été obtenues sur MTs individuels. Peu de choses sont connues lorsqu'ils sont en faisceaux, alors qu'ils sont souvent organisés dans cette configuration *in vivo*. Ce manque de données est notamment dû à la complexité et à la densité des réseaux *in vivo*, bien que certaines structures composées de faisceaux de MTs puissent être étudiées, comme le cil (Baba, 1972), le flagelle (Ishijima et al., 1994) ou l'axone (Samsonov et al., 2004). Il nous paraît donc important d'obtenir de nouvelles données sur la mécanique des MTs en présence de MAPs qui induisent la formation de faisceaux, afin de mieux en comprendre l'effet sur les mécanismes d'auto-organisation des

réseaux de MTs dans les cellules.

Objectifs de la thèse

Les mécanismes conduisant à l'auto-organisation des MTs en faisceaux et notamment le rôle de MAPs telles que les MAP65s restent peu connus. L'utilisation d'un système biomimétique permettant d'étudier l'assemblage d'un réseau de MTs géométriquement contraints (ce dans les limites observées dans les cellules), pourrait permettre d'ouvrir de nouvelles approches pour l'étude du rôle spécifique des MAPs, seules ou en complexes, *in vitro*.

Les objectifs de ma thèse se sont articulés autour de deux points :

- 1) Comment les MAP65s organisent-elles un faisceau de MTs ?
Modulent-elles les propriétés mécaniques des MTs ?**
- 2) Mettre au point un dispositif expérimental permettant le contrôle géométrique de l'assemblage de MTs, par l'utilisation de la technologie de micro-patterning.**

→ *Validation de la technique par la reconstitution de sous-modules de fuseaux mitotiques (i.e. midzone).*

Introduction de mon travail de thèse

Le cytosquelette de MTs joue un rôle essentiel dans la morphogénèse cellulaire. Nous venons de voir dans le chapitre introduction que ces réseaux sont restructurés par la cellule tant au cours de la morphogénèse que durant le cycle cellulaire afin de répondre à ses besoins, le tout étant finement régulé par de nombreuses MAPs. Comme je l'ai décrit précédemment, ces réseaux de MTs peuvent être organisés soit à partir d'un centre organisateur de MTs, soit de façon acentrosomale (ils sont alors dans ce dernier cas majoritairement organisés en faisceaux). Dans ce contexte, une partie de mon travail de thèse a été d'étudier les mécanismes qui permettent la formation de faisceaux à partir de MTs individuels. Cette étude a débuté sur la base d'observations du comportement dynamique de MTs dans des cellules de plantes (Shaw et al., 2003, Dixit et Cyr 2005). Ces observations ont montré que des faisceaux de MTs se forment après la rencontre entre MTs mobiles et résidents dans le cortex cellulaire, et leurs co-alignements. La MAP65-1 est co-localisée avec ces MTs corticaux (Van Damme et al., 2004, Lucas et al., 2011), et elle ponte les MTs *in vitro* (Wicker-Planquart et al., 2004, Smertenko et al., 2004). Le but de mon étude a été d'étudier son implication dans les événements de co-alignement observés *in vivo*. Pour répondre à cette question j'ai amélioré un protocole expérimental mis au point au laboratoire (Fache et al., 2010), permettant de générer des rencontres de MTs dynamiques *in vitro* et d'observer la constitution d'un réseau en temps réel et en microscopie TIRF. L'observation de déformations importantes des MTs pour se co-aligner m'a amené à émettre l'hypothèse selon laquelle les MAP65s pourraient moduler les propriétés mécaniques des MTs. En effet, les MTs sont des filaments très rigides (cf. chapitre V) et les déformations de MTs individuels et de faisceaux que nous avons observés pourraient s'expliquer par une augmentation de la flexibilité induite par la MAP65-1 et Ase1. J'ai donc dans une deuxième étape, développé une méthode pour mesurer la longueur de persistance de MTs et de faisceaux de MTs.

En parallèle à cette étude, j'ai mis au point une méthode de micro-patterning des MTs afin de contrôler spatialement leur croissance en 2D. J'ai validé l'efficacité de cette technique par la reconstitution de sous-modules de fuseau mitotique, en utilisant deux disques de micro-patterns mimant des asters de MTs avec une polarité sélective (avec une majorité d'extrémités (+) des MTs à l'extérieur du micro-pattern).

Résultats

V. Résultats

a. Quantification of MAPs and molecular motor activity on geometrically controlled microtubule networks.

i. Introduction

Les réseaux de MTs *in vivo* sont réorganisés en fonction des besoins de la cellule comme décrit dans l'introduction (cf. chapitre III). Dans la majorité des cellules eucaryotes, la densité et la complexité de ces réseaux sont très grandes ce qui rend l'étude de leurs assemblages et leurs dynamiques particulièrement difficile. De plus, la dimension 3D de ces structures restreint l'observation directe d'événements individuels. Ainsi, l'activité de MAPs et de moteurs moléculaires dans des réseaux de MTs est pour l'instant analysée *in vivo* essentiellement par des approches de génétiques (délétions ou surexpressions des protéines d'intérêts). De plus, la présence d'autres protéines ayant un effet complémentaire ou redondant par rapport aux MAPs étudiées ne permet pas toujours d'identifier leur activité propre.

Au cours des dernières années, de nombreux systèmes biomimétiques ont été développés dans le but de caractériser les propriétés des MAPs et d'étudier leurs effets sur l'organisation de réseaux de MTs. Différents essais expérimentaux ayant des degrés de complexité protéique plus ou moins importants sont décrits dans la littérature (extrait d'œuf de xénope, extrait cellulaire, protéine purifiée).

Pour comprendre comment les cellules organisent de façon hautement reproductible des réseaux de MTs à l'architecture complexe, il faut pouvoir reproduire *in vitro* des assemblages avec une géométrie précise. Or dans la plupart des systèmes biomimétiques développés, la notion de géométrie présente dans la cellule est perdue (Hentrich et al., 2010 ; Bieling et al., 2010 ; Tulin et al., 2012). Cependant ces méthodes permettent une étude à haute résolution qui peut aller jusqu'à l'observation de molécules uniques (Bieling et al., 2010).

Afin de reconstituer des réseaux de MTs à l'échelle cellulaire, certaines approches ont été développées. Par exemple, un aster de MTs peut être créé à partir de billes de chromatines (Heald et al., 1996), ou en utilisant des centrosomes comme supports de nucléation (Evans et al., 1985). Cependant, dans ces systèmes, le contrôle de la géométrie de nucléation reste aléatoire spatialement. Pour étudier l'auto-organisation des réseaux de MTs dans des systèmes contraints 3D, certaines équipes ont développé des dispositifs permettant de confiner des MTs dans des cuves de verre, de téflon ou encore dans des vésicules (Holy et al., 1999 ; Laan et al., 2012 ; Cosentino-Lagomarsino et al., 2007 ; Pinot et al., 2009 ; Keller et al., 2008). D'autres

équipes ont utilisé, comme dans l'étude de Dinarina et al. (2009), une méthode qui permet d'étudier les mécanismes d'auto-assemblage de fuseaux bipolaires de MTs organisés autour de billes de chromatine attachées sur des micro-patterns. Par ailleurs, certains groupes se sont concentrés sur la contrainte spatiale que représente la nucléation de MTs afin de créer des réseaux de MTs qui miment ceux présents dans la cellule et ce, pour étudier ultérieurement l'organisation du réseau par des MAPs. Par exemple, Uppalapati et al., (2011) ont utilisé des électrodes pour aligner les MTs en fonction de leurs polarités électriques afin de reconstituer un module de fuseaux bipolaires. Enfin, d'autres dispositifs expérimentaux ont été mis au point afin d'attacher des fragments de centrosomes ou de la gamma-tubuline sur des micro-patterns (Shang et al., 2009 ; Yang et al., 2006).

Dans ce contexte, le but de mon travail de thèse a été d'adapter la technologie de micro-patterning, précédemment développé au laboratoire pour les filaments d'actines (Reymann et al., 2010), au contrôle spatial de la formation de réseaux de MTs.

Un des problèmes majeurs rencontrés jusqu'ici dans les systèmes biomimétiques est de trouver un moyen de nucléer des MTs sur un support. Le complexe γ -TuRC étant difficile à exprimer et/ou à purifier, il est nécessaire d'utiliser d'autres voies pour la nucléation des MTs *in vitro*. Différents supports de nucléation ont été décrits : les axonèmes, les centrosomes ou encore des protéines d'extrémité (+) de MTs comme H2 qui correspond à un domaine de CLIP170 (Arnal et al., 2004), ou XMAP215 (Popov et al., 2002). Des amorces de MTs stabilisées par du taxol ou du GMPCPP constituent une alternative et sont probablement le support de nucléation le plus simple à manipuler *in vitro*. Aussi, j'ai développé un protocole permettant d'obtenir des « micro-amorces » de MTs stabilisés avec du GMPCPP et du taxol qui ont une longueur de quelques centaines de nanomètres. Les dimensions réduites de ces amorces offrent la possibilité d'en attacher une forte densité sur des patterns de petite surface (i.e disque de $9 \mu\text{m}^2$). La polymérisation des MTs à partir de ces micro-amorces se réalise environ à 80% par les extrémités (+), extrémités qui sont distales par rapport au micropattern. Cette polarité sélective de la polymérisation des MTs reste non comprise. Elle peut cependant s'expliquer par l'encombrement stérique sur la surface activée du micropattern qui résulte de la forte densité des micro-amorces, ce qui pourrait bloquer l'élongation de l'extrémité (-).

Un autre problème que j'ai rencontré lors de la mise au point de cette technique est la passivation des lames et lamelles de verre. En effet, les différents traitements de surface PEG décrits dans la littérature tels que le PLL-PEG et le silane-PEG utilisés individuellement ne permettent pas d'éviter l'adsorption non spécifique à la fois des MAPs et des MTs (Ionov et

al., 2010 ; Bieling et al., 2010). Cependant lorsque l'on applique ces deux types de traitements séquentiellement sur une surface en verre, on peut combiner leurs qualités de répulsion des protéines. J'ai donc utilisé des surfaces traitées avec du silane-PEG ce qui m'a permis d'éviter une adsorption non spécifique de la tubuline et des protéines étudiées. Cette surface silane-PEG est suivie d'un traitement avec du PLL-PEG qui offre une bonne répulsion aux protéines associées aux MTs. Par la suite, j'ai pu dessiner des zones adhésives (les micro-patterns) sur cette surface et y attacher spécifiquement des micro-amorces de MTs.

Grâce à cette technique, j'ai pu mimer des asters de MTs (i.e. MTs qui irradient à partir de disques et polymérisent par leurs extrémités (+)). J'ai utilisé une forme de pattern comprenant deux disques séparés de 20 μm mimant ainsi les deux asters d'un fuseau mitotique. L'interdigitation de MTs de polarités opposées ainsi que leur association en faisceaux par des MAP65s (Ase1 dans cette étude), nous ont permis de mimer un sous-module du fuseau mitotique, la midzone. Ce sous module permettra d'étudier l'effet de différentes protéines impliquées dans son organisation et fonction, dont les moteurs moléculaires. J'ai initié l'étude de Klp2 (*s.pombe*), un moteur moléculaire de la famille des kinésines-14, pour analyser l'effet synergique de ces deux protéines sur l'organisation des MTs anti-polaires de la midzone (travail en cours).

ii. Résumé de l'article de thèse

L'organisation spatiale des réseaux de MTs est notamment impliquée dans la polarisation et la division cellulaire. L'organisation de ces réseaux est finement régulée par des centaines de protéines associées aux MTs. La fonction spécifique de chacune d'entre elles est difficile à étudier directement *in vivo* en raison de la densité et de la complexité des réseaux. Le but de cette étude a été de mettre au point une méthode de « micro-patterning » de MTs afin d'imposer une géométrie d'assemblage pour les MTs dans des limites qui se rapprochent de celles observées dans les cellules. La nucléation des MTs à partir de zones activées utilise des micro-amorces de MTs. Cette méthode, qui permet d'analyser l'effet d'une ou plusieurs protéines purifiées sur l'assemblage des MTs, peut être appliquée pour contrôler la croissance des MTs et la création de réseaux de MTs complexes. Pour valider cette technique, nous avons sélectionné l'interaction de deux réseaux radiaux de MTs dynamiques et polarisés, mimant la configuration d'un fuseau bipolaire afin d'analyser le rôle de la MAP65 de levure, Ase1 et d'un moteur moléculaire de levure, Klp2, sur la formation de faisceaux anti-parallèles. Cette analyse a révélé une synergie entre Ase1 et Klp2 dans la formation de faisceaux de MTs anti-parallèles.

Les données obtenues sont acceptées pour publication dans la revue *Cytoskeleton*, aussi le détail des résultats est donné dans le manuscrit ci-joint (Portran et al.).

Article de recherche 1

Quantification of MAPs and molecular motors activities on geometrically controlled microtubule networks

Didier Portran¹, Jeremie Gaillard¹, Marylin Vantard^{1*}, Manuel They^{1*}

¹Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, UMR5168, CNRS/CEA/INRA/Université Joseph Fourier, Grenoble, France

* Correspondence should be addressed to: marylin.vantard@cea.fr, manuel.thery@cea.fr
LPCV/iRTSV/CEA, 17 rue des Martyrs, 38054, Grenoble, France
Tel: 00 (33) 4 38 78 91 26

Abstract

The spatial organization of the microtubule (MT) network directs cell polarity and mitosis. It is finely regulated by hundreds of different types of microtubule-associated proteins (MAPs) and molecular motors whose specific functions are difficult to investigate directly in cells. Here, we have investigated their functions using geometrically controlled MT networks in vitro in cell-free assay. This was achieved by developing a new method to spatially define MT nucleation using MT micro-seeds adsorbed on a micro-patterned glass substrate. This method could be used to control MT growth and the induction of complex MT networks. We selected the interaction of two radial arrays of dynamic and polarized MTs, to analyze the formation of the central antiparallel MT bundle. We investigated the effects of the MT cross-linker Ase1 and the kinesin motor Klp2, which are known to regulate MTs organization in the spindle midzone. We thus identified the respective roles of each protein and revealed their synergy on the establishment of stable anti-parallel MT bundles by quantifying MT interactions over hundreds of comparable MT networks.

Introduction

Microtubules (MTs) are essential to all eukaryotic cells. They assemble into dynamic networks supporting many different cellular functions ranging from intra-cellular transport to spatio-temporal orchestration of cell mitosis. Cell physiology is therefore highly sensitive to MT network spatial organization. Many mechanisms have been developed and selected during evolution to ensure the precision and reproducibility of MT network architecture. MT networks can adopt a large variety of configurations from radial to linear arrays (Bartolini and Gundersen, 2006; Mimori-Kiyosue, 2011). These architectures result from the sequential nucleation, growth and spatial organization of MTs.

MT organization is regulated by numerous microtubule-associated proteins (MAPs) and molecular motors, which crosslink, regulate MT assembly/organization and exert mechanical forces on MTs (Jiang and Akhmanova, 2011; Walczak and Shaw, 2010; Loughlin et al., 2011; Furuta and Toyoshima, 2008). Due to the critical role of MTs in the regulation of core cell functions, there is a high degree of molecular redundancy between the multiple MAP types present in each cell (Sasabe and Machida, 2006). It is therefore difficult to identify their respective contribution to network architecture and even more difficult to quantify such contributions, although several experimental approaches have attempted to address these questions.

Mitotic spindle geometry is most often used as a good readout for MT organization defects due to its reproducible and regular geometry (Walczak et al., 1998; Sharp et al., 2000; Loughlin et al., 2008). Defective mitotic spindle conformations, such as monopolar, multipolar elongated or short spindles, led to the identification of activities associated with several MAPs and motors (reviewed in (Wordeman, 2011)). The regular and reproducible shape of yeast cells in which there are only few MT bundles (3 to 5) also provides a good readout for MT organization compared to the hundred MTs per cell in multicellular organisms that can adopt highly variable architectures (Tran et al., 2001; Loiodice et al., 2005).

However, in these experimental approaches, the MAP activity is indirectly inferred from the consequences of its loss. Therefore, to help draw a more specific and direct conclusion on the role of a MAP on MT organization and functioning, it is necessary to add the MAP in to a situation where it was not present, rather than to remove it. These sorts of manipulations can be performed in reconstituted *in vitro* systems. These systems are advantageous because MT networks can be created out of the minimum necessary

components and thereby artificially reducing the possibility of redundancy when testing the function of a MAP.

In reconstituted systems, MTs are either free to move (in bulk solution or on surfaces) (Kapitein et al., 2005) or randomly attached to surfaces (Bieling et al., 2010; Subramanian et al., 2010; Tulin et al., 2012), therefore the spatial information that was provided by the reproducible shape of yeast or mitotic spindle architecture is lost. To get such information, it is necessary to impose controlled geometrical boundary conditions. This has been achieved by using micro-fabricated devices such as micro-wells, micro-grooves or micro-patterned surfaces. The positioning of MT aster-like structures in microwells, the walls of which were coated with kinesins, revealed the contribution of pushing and pulling forces in the aster centering mechanism (Holy et al., 1997; Laan et al., 2012). The micro-patterning of DNA-coated beads, capable of inducing MT nucleation in mitotic cell extracts, can be used to study the spindle poles self-organization and focusing by molecular motors (Dinarina et al., 2009).

Here we have developed a new method that uses micropatterned surfaces to control MT spatial nucleation and enable us to work on define MT patterns. In contrast to in vitro experiments studying the self-organization of free MTs (Nedelec et al., 1997; Surrey et al., 2001), our goal was to investigate how MAPs and molecular motor regulate MT organization when they encounter at specific orientations predetermined by geometrical boundary conditions. With this technique, we were able to induce the formation of more or less complex but controlled MT network geometries in which dynamic MTs could exist as single entities or as parallel or anti-parallel bundles. In validating the MT networks created by this method, we chose aster-like structures to compare the specific contributions of Ase1 (the yeast ortholog of human PRC1, *Drosophila* Feo and plant MAP65-1), which has been shown to be involved in anti-parallel MT alignment and spindle formation (Loiodice et al., 2005; Janson et al., 2007; Bieling et al., 2010; Tulin et al., 2012), and of Klp2 (member of the kinesin 14 family, yeast ortholog of human HSET, *Drosophila* Ncd, and plant ATK5), which has been shown to be involved in parallel MT stabilization, anti-parallel MT sliding and spindle length control (Carazo-Salas et al., 2005; Janson et al., 2007; Braun et al., 2009; Fink et al., 2009).

Results

Micropatterning of MT seeds

The MT interaction assay we have developed is based on the growth of MTs out of micropatterned nucleation sites. It requires the specific attachment of MT nucleation templates onto micro-patterned sites and their elongation in the presence of purified tubulin dimers. MT nucleation templates consisted of short (0.5 μm on average) stabilized MTs (later referred to as MT seeds) obtained by polymerizing both Alexa561-labelled and biotinylated tubulin at 50 μM , in the presence of GMPCPP and taxol at 37°C (Figure S1). To prevent the non-specific adsorption of these MT seeds on the substrate, the glass coverslip was cleaned, oxidized and then treated with a silane functionalized with Poly-Ethylene-glycol (PEG) chains (step 1-2 in Figure 1A). The dried PEG-coated slide was placed into contact with a photomask, on which the micropatterns of interest were transparent, and exposed to deep UV light (wavelength below 200 nm) (step 3 in Figure 1A). Deep UVs induced the oxidation of the exposed regions making these regions competent to absorb protein (Azioune et al., 2009). The micro-patterned slide was then mounted in a flow chamber, in which a solution of neutravidin was added (step 4 in Figure 1A). To prevent the non-specific adsorption of MAPs, the micro-patterned coverslip was further incubated with poly-lysine-PEG to improve substrate passivation (step 5 in Figure 1A). Biotinylated MT seeds were then introduced in the chamber in a solution that flowed over the micropattern to ensure specific linkage to neutravidin on the micropatterns and further elongated by the addition of Alexa488-labelled tubulin in presence of GTP (step 6-7 in Figure 1A). Depending on the choice of micropattern, we could induce MT growth out of any kind of nucleation geometries such as dots, curved or straight bars (Figure 1B, movie S1).

Controlled MT orientation

MT orientations appeared to depend on the geometry of the nucleation region. Their growth was observed in real-time using dual-view total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy under temperature controlled-conditions at 32°C. When nucleated from a bar micropattern, most MTs had a biased orientation orthogonal to the longitudinal axis of the bar (Figure 2A). In contrast, MTs appeared radially oriented and randomly distributed through 360° when nucleated from a dot-shaped micropattern (Figure 2B).

MTs orientations could be controlled by using longer MT seeds (2-5 microns). In this

case, fluid flow appeared to align MT seeds, which were no longer evenly oriented on the micropattern surfaces. In these conditions, MT growth from a dot-shaped or a bar shaped micropattern were biased along the direction of the flow during MT seeds adsorption (Figure S2).

Controlled MT polarity

The direction of MT polarity could be inferred from the measurement of growth speed since minus ends grow at lower rates than plus ends (Walker et al., 1988). Distributions of growth speeds revealed that, regardless of the geometry of the nucleation region, a mean of 80% (SEM, 3 %) of MTs had their minus end on the micro-pattern and their plus end positioned away from it (Figure 2C). Therefore, nucleation from short MT seeds on dots appeared to mimic the radial organization of aster-like structures (and subsequently referred to as asters) with minus ends at the center and plus ends at the periphery.

Imaging of MAP-induced MT organization in real time

Isotropic and polarized growth of MTs from dots allowed us to induce controlled anti-parallel MT interactions at various angles between two asters (Figure 3A). These interactions between asters were selected to test the specific role of a MAP, Ase1 and a molecular motor Klp2. Full length recombinant His-Ase1 was purified from E.coli (Figure S3A) that have an apparent Kd of 41 ± 7 nM (Figure S3C) and functionally tested by MT bundling assays (Figure S3B). Full-length recombinant SNAP-Klp2-His was purified from E.coli (Figure S3A), (apparent Kd 72 ± 5.8 nM, Figure S3D). Its functionality was tested by ATPase assays in presence of MTs (Figure S3E) and by its ability to slide MTs (Figure S3F). Real time monitoring of MT behaviors showed that in presence of either MAP, MT interactions between two asters could lead to MT reorientation and/or stabilization. In the absence of either MAP, anti-parallel MT interactions appeared capable of only inducing transient MT reorientation and anti-parallel alignment (Figure 3B and movie S2). In the presence of Klp2, anti-parallel MTs have been observed to co-align (Figure 3C and movie S3). However, MT depolymerization or detachment from the micro-pattern by sliding led to the dismantling of anti-parallel bundles after a few minutes (Figure 3C and 3D and movie S3 and S4). In the presence of Ase1, anti-parallel bundles could also form between two asters and these bundles seemed to persist for longer periods than with Klp2 (Figure 3E and movie S5). In the presence of both Ase1 and Klp2, anti-parallel MTs with large angular deviations (40° in Figure 3F compared with 22° for Ase1 alone in figure 3E) could be reoriented and stabilized (Figure 3F

and movie S6).

Identification of stable MAP-induced MT organization

To identify the steady organizations of the MT spindle like array with those MAPs, snapshot of patterns in these different conditions were taken after 30 min of polymerization (Figure 4). Because the positions of the two nucleation sites of the asters were defined by the micropattern, these positions also defined the two reference points for overlaying images to create an overall average image. MT fluorescence intensities were normalized such as single MTs had the same fluorescence intensity in all conditions. Averaged image provided an intensity distribution of the MTs around the two asters and revealed local accumulation of MTs in response to MAPs (Figure 4A). The visual information provided by the color-coding of these averaged distributions (Figure 4B) could be turned into a quantitative measure by performing a linescan along the midline separating the two asters (Figure 4C). This analysis confirmed that Klp2 alone had limited effect on durable MT accumulation along the central axis connecting the two asters. Strikingly, Ase1 induced a broad MT accumulation at the central axis. This showed that Ase1 has limited reorientation capacities since anti-parallel bundles could not completely align with the central axis, probably due to the cross-linking effect preventing MT sliding. Interestingly, Klp2 appeared capable of affecting this distribution of MTs because in response to the cooperation of Klp2 and Ase1, MTs accumulated along the central axis between the two nucleation sites with a much sharper angular distribution (Figure 4B, C).

Therefore we conclude that Ase1 is capable of aligning and slightly reorienting anti-parallel MTs. However, its crosslinking activity inhibits MT sliding and more substantial MT reorientation. Klp2 is capable of reorienting and sliding anti-parallel MTs along each other but does not support the formation of stable crosslinks. Therefore Ase1 and Klp2 appear to have a synergistic effect on MT bundle formation in which Klp2 reorients and aligns anti-parallel MTs while Ase1 crosslinks and maintains them in a steady-state (Figure 5).

Asters separation modulates anti-parallel bundle formation

We next tested whether the distance between two MT asters could affect the anti-parallel MT organization by comparing bundle formation between asters separated by 15 μm and 30 μm . We measured the MT bundles accumulation in presence or in absence of Ase1. In control conditions, i.e. in the absence of MAP, anti-parallel MT bundles could form only in short spindle-like structures (Figure 5A-B). In presence of Ase1, anti-parallel bundles could

form on long and short spindle-like structures but the bundling region appeared wider on the short ones (Figure 5A and 5B). To test whether this higher number of anti-parallel MT bundles in short spindles resulted from increased MT densities in the overlapping regions or from variations in Ase1 bundling efficiency, we normalized the Ase1-induced fluorescence signal along the linescan to the fluorescence measured in control conditions. The angular variations of the normalized fluorescence signal were quite similar in short and long spindles (Figure 5C). This suggested that Ase1 efficiency were identical in both conditions and that the increase of MT bundles in short spindles resulted from more frequent MT overlaps. Indeed, it is quite intuitive that, for a given concentration of free tubulin, and thus for a given MT length distribution, variations in spindle length modulates the local density of MT overlap in between the asters and thus the number of anti-parallel MT bundles.

Discussion

We have developed a new method to direct dynamic MT self-organization into controlled network geometries. This has been achieved by improving previous surface micro-patterning protocols for in vitro assays (Reymann et al., 2010) through precisely defining the location of MT nucleation sites, preventing the non-specific adsorptions of tubulin and MAPs and developing efficient MT nucleation seeds.

The grafting of MT micro-seeds onto micropatterns significantly improved the nucleation efficiency compared with using micro-contact printed centrosome fragments (Shang et al., 2009) or micro-patterned gamma-tubulin (Yang et al., 2006). In addition, MT nucleation from short seeds appeared to play a key role in the polarized organization of aster-like arrays. Short seeds were densely packed and randomly oriented on the micropatterns. MT plus-ends grew more rapidly than minus-ends ($1.7 \pm 0.2 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ versus $0.4 \pm 0.1 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$). Thus, they could more efficiently escape from the micropattern without being perturbed by the local steric constraints. This could account for the presence of a large majority ($80\% \pm 3\%$) of MT plus-ends growing out of the micropattern. MTs polymerized from long MTs seeds (2-5 μm) appeared less reproducibly polarized (60% of MT plus ends out of the micropattern). This could be explained by the fact that longer seeds were less densely packed, allowing the unconstrained growth of both rapid plus-ends and slow minus ends.

The double surface passivation with silane-PEG and PLL-PEG offers unprecedented repellent properties and therefore preserves the unconstrained growth of MTs out of the micro-patterned sites compared to glass (Shang et al., 2009), silica (Yang et al., 2006). Hence

the highly controlled surface and biochemical conditions enable MTs to assemble into predictable and reproducible dynamic networks.

Surface micro-patterning has greatly contributed to the identification of the morphogenetic rules guiding intra-cellular as well as multi-cellular organizations (Théry, 2010). This method, when applied to cell-free biomimetic approaches, has revealed the critical role of actin filament nucleation geometry in the regulation of network architecture and the development of mechanical forces (Reymann et al., 2010, 2012). Our method now paves the way for the quantitative description of the morphogenetic rules governing the MT network architecture and dynamics.

In this study, we selected the aster-pair arrangements to examine the interaction of MTs with opposed polarities in the presence of MAPs and molecular motors. One of the key features of this assay is that it is based on dynamic MTs. Our analysis of averaged asters interactions showed that no stable anti-parallel MT bundles or specific organization can be formed in the absence of Ase1 or Klp2. In the presence of Klp2, anti-parallel MTs can reorient and align MTs but this overlap is short-lived since MTs can slide and separate or depolymerize. It seems relevant to take into account this last phenomenon when considering MT network organization *in vivo* because MT assembly and disassembly would also modulate the actual contribution of a MAP to the eventual network architecture. Our results also suggest that Ase1 may reduce the depolymerization rate of MTs in anti-parallel bundles. The stabilization of MTs inside a bundle organized by MAP65s has not yet been well defined. However, *in vivo* and *in vitro* studies have shown that MTs bundled by MAP65-1, Ase1 homolog in plants, are resistant to depolymerization (Li et al., 2007; Meng et al., 2010; Van Damme et al., 2004). A recent study has also shown that MT bundles organized by MAP65-4, (belonging to the MAP65 family in *Arabidopsis thaliana*) has a rescue factor activity by acting as a brake to depolymerization (Fache et al., 2010). Furthermore, the crosslinking activity of Ase1 (Janson et al., 2007) presumably prevented Klp2-induced MT separation after sliding (Braun et al., 2011) and can explain why the synergy between Klp2 and Ase1 was necessary in the formation of stable anti-parallel bundles.

In this system we could also modulate the geometrical configurations of spindle-like structures and reveal the effect of spatial boundary conditions on the formation anti-parallel MT bundles. It clearly appeared that variations of MT densities in response to asters separation do not affect Ase1 bundling efficiency and that the number of over-lapping MTs

directly impacts the final number of bundles.

The controlled and reproducible geometry of the MT networks allowed the detection of subtle architectural changes by comparing the network geometry at steady state to a standard reference without MAPs. The observation of many similar asters at a given time point indirectly revealed the fluctuations of the organization process. Our method is also fully compatible with high quality time-lapse imaging, which we used to characterize the transient MT organization like MTs sliding induced by Klp2. The low density of MTs, and high quality images from TIRF microscopy enabled the tracking of single MTs or MT bundles. Therefore the automatic acquisition and analysis of thousands of aster pictures or time-lapse “on chip” should provide the necessary amount of data to detect significant changes in MT dynamics and organization.

In conclusion, this new method permits the formation of complex but reproducible MT network geometries, made of multiple MTs with controlled polarities. In addition to quantifying the role of MAPs, micropattern-defined MT nucleation sites can also be used to study MT network self-organization in response to geometrical constraints, and should prove useful in the investigation of the complex mechanisms underlying intra-cellular organization.

Materials and methods

Tubulin purification

Tubulin was purified from fresh bovine brain by three cycles of temperature-dependent assembly/disassembly according to Shelanski et al. (Shelanski, 1973) in BRB80 buffer (BRB buffer: 80 mM PIPES, pH 6.8, 1 mM EGTA, and 1 mM MgCl₂ plus 1 mM GTP). MAP-free neurotubulin was purified by cation-exchange chromatography (EMD SO, 650 M, Merck) in 100 mM MES, pH 6.8, supplemented with 1 mM MgCl₂ and 1 mM EGTA as described previously (Malekzadeh-Hemmat et al., 1993). Purified tubulin was obtained after a cycle of polymerization and depolymerization.

Tubulin labeling

Fluorescent tubulin (ATTO-488-labeled tubulin and ATTO-565-labeled tubulin) and biotinylated tubulin were prepared according to Hyman et al. (Hyman et al., 1991). MTs from neurotubulin were polymerized at 37°C for 30 min and layered onto cushions of 0.1 M NaHEPES, pH 8.6, 1mM MgCl₂, 1mM EGTA, 60% volume/volume (v/v) glycerol and sedimented by high centrifugation at 30°C. Then MTs were resuspended in 0.1 M NaHEPES, pH 8.6, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 40% (v/v) glycerol, and labeled by adding 1/10 volume 100 mM NHS-ATTO (ATTO Tec) or NHS-Biotin (Pierce) for 10 min at 37°C. The labeling reaction was stopped using 2 volumes of 2X BRB80, containing 100 mM potassium glutamate and 40% (v/v) glycerol, and then MTs were sedimented onto cushions of BRB80 supplemented with 60% glycerol. MTs were resuspended in BRB80, and a second cycle of polymerization and depolymerization was performed before use.

Ase1 expression and purification

Recombinant His-Ase1 and His-Ase1-GFP were expressed and purified according to Janson et al. (Janson et al., 2007). Bacterial expression vectors pPT184 encoding His-Ase1 or His-Ase1-GFP (kindly provided by Dr. Janson) were transfected into Rosetta2®(DE3)pLysS *E. coli* (VWR). Proteins expression was induced by 6 h incubation with 0.5 mM IPTG at 25°C. Soluble proteins were extracted from a 1:1 culture in lysis buffer (NaH₂PO₄ 25mM, NaCl 300 mM, imidazole 30 mM, lysozyme 0.1 mg/ml, DNase1 20 µg/ml, NP-40 1%; pH7.4) using probe-tip sonicator. Lysate was added to Ni sepharose HP beads (GE), which were washed (NaH₂PO₄ 25mM, NaCl 300 mM, imidazole 30 mM; pH7.4) followed by elution (NaH₂PO₄ 25 mM, NaCl 300 mM, imidazole 250 mM; pH7.4) and dialysis over night in

buffer (NaH₂PO₄ 25 mM, NaCl 300 mM ; pH7.4).

To determine the K_d of Ase1, 50 nM of recombinant His-Ase1-GFP were mixed with various concentrations of taxol stabilized MTs (ranging from 0 to 1000 nM) in NaH₂PO₄ 25 mM, NaCl 100 mM, pH7.4 and incubated for 30 min at room temperature. Samples were then centrifuged during 20 min at 100,000 g at 25°C. Supernatants were kept and pellets were resuspended in NaH₂PO₄ 25 mM, NaCl 500 mM, pH7.4. The amount of His-Ase1-GFP in the pellets and supernatants was determined by spectrofluorimetry. All tubes were silanized to limit non-specific adsorption of proteins (Sambrook et al., 1989). The K_d of Ase1 was determined as 41 ± 7 nM (figure S3C).

Klp2 expression and purification

Full-length Klp2 cDNA (gratefully provided by Dr. S Diez) was cloned into the pET-30a(+) expression vector (Novagen) with Snap Tag to N-Ter and His Tag to C-Ter. The recombinant N-terminal SNAP tagged and C-terminal His Tagged fusion proteins were transfected into Rosetta2®(DE3)-pLysS *E. coli* (VWR) and expression was induced with 0.1 mM IPTG for 16 h at 15°C. Harvested cells were resuspended in buffer A (50 mM sodium phosphate buffer pH 7.4, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mM ATP) containing 200 mM NaCl and protease inhibitors (Roche), and lysed in 0.05 % v/v Triton X-100 (Sigma) by sonification. The lysates were centrifuged 30 min at 25000g and 4°C. The clear lysates were loaded onto a NiSepharose HP column (GE Healthcare). The column was washed with buffer A containing 100 mM NaCl and 20 mM imidazole. Proteins were eluted in buffer A containing 100 mM NaCl and 250 mM imidazole then desalted into buffer A containing 100 mM NaCl without ATP, and snap-frozen in liquid nitrogen.

The K_d of recombinant SNAP-klp2-His was determined as described for Ase1, except that 40 nM of Klp2 labelled with ATTO-565 was mixed with various concentrations of taxol stabilized MTs (ranging from 0 to 1500 nM) in buffer A containing 50 mM NaCl and supplemented with 1 mM AMPPNP (Jena Biosciences). The K_d of Klp2 was determined as 72 ±5.8 nM (figure S3D).

ATPase assay

ATPase assays were performed using a continuous coupled assay with ATP regeneration according to Hackney et al (Hackney and Jiang, 2001). Reactions (200 μ l) were performed at room temperature in ATPase buffer (25 mM ACES (pH 6.9)/2 mM magnesium acetate/2 mM potassium-EGTA/0.1 mM potassium-EDTA/1 mM 2-mercaptoethanol/1 mM ATP/2 mM phosphoenolpyruvate/0.25 mM NADH/5 μ g/ml pyruvate kinase/3 μ g/ml lactate dehydrogenase), and started by the addition of Klp2 (50 to 250 nM). ATPase activity of Klp2 was enhanced in the presence of taxotere stabilized MTs (2.5 μ M). In this assay, the V_{\max} of the ATPase activity was 1.1 s^{-1} in the presence of MTs (figure S3E).

Surface Micro-patterning

Glass coverslips were cleaned by successive chemical treatments: 30 min in acetone, 15 min in ethanol (96,5°), rinsing in ultrapure water, 2 hours in Hellmanex III (2% in water, Hellma), and rinsing in ultrapure water. Coverslips were then dried, filtered airflow and oxidized in a plasma cleaner (FEMTO; Diener Electronics) during 2 minutes at 60mW. Coverslips were then dried, filtered airflow and oxidized in a plasma cleaner (FEMTO; Diener Electronics) during 2 minutes at 60mW. Coverslips incubated overnight in a solution of triethoxy-silane-PEG (30KDa, PSB-2014, creativePEGwork) 1mg/ml in ethanol 96.5° and 0.02% of HCl, with gentle agitation at room temperature. Coverslips were then successively washed in ethanol and ultrapure water, dried with filtered air and store at 4°C away from dust. Passivated coverslips were placed into contact with a photomask (Toppan) with a custom-made vacuum-compatible holder and exposed to deep UV (7mW/cm² at 184nm, Jelight) for 30 seconds. Deep UV exposure through the transparent micropatterns on the photomask created oxidized micro-patterned regions on the PEG coated coverslip (Azioune et al., 2010).

Micro-patterned MT growth

A flow cell chamber with an approximate volume of 30 μ l was constructed with double-sided tape (70 μ m height) between a micro-patterned and a passivated coverslips. The perfusion chamber was flowed with neutravidin (25 μ g/ml in BRB80; Pierce), then passivated for 1 min with PLL-g-PEG (Pll 20K-G35-PEG2K, Jenkem Technology) at 0.1 mg/ml in 10 mM Hepes (pH = 7.4) and further washed with 300 μ l of BRB80.

MT micro-seeds were polymerized using 50 μ M of tubulin (85% of biotinylated tubulin and 15% of ATTO-565-labelled tubulin) in presence of 0.5mM of GMPCPP and 20 μ M of Taxotere in BRB80 at 37°C for 10 min. Micro-seed length and structure were

controlled by negative-stain electron microscopy observations. Micro-seeds were stained on grids with 2% (w/v) uranyl acetate and observed on a CM12 microscope (FEI Eindhoven) operating at 120 kV.

MT micro-seeds were flowed into the chamber at 1 μ M, the flow was stopped for five minutes and then the chamber was thoroughly washed. MT seeds were elongated with a mix containing 15 μ M of tubulin (30% ATTO-488-labelled tubulin and 70% unlabeled tubulin) in BRB80 supplemented with 50 mM NaCl, 50 NaPi, 1 mM of GTP, an oxygen scavenger cocktail (2 mg/mL glucose, 80 μ g/mL catalase, and 0.67 mg/mL glucose oxidase), 1% BSA, 0.025% of methyl cellulose (1500 CP, from Sigma) and with or without MAPs. Ase1 and Klp2 were respectively used at a concentration of 33 nM and 5 nM.

Imaging

MT dynamics were visualized using an objective-based azimuthal TIRF microscope (Nikon eclipse Ti, modified by Roper scientific) and Evolve 512 camera (Photometrics). Microscope stage was kept at 32°C using a warm stage controller (LINKAM MC60). Excitation was achieved using 491 nm and 561 nm lasers (Optical Insights). Time-lapse recording (one frame every 5 s) was performed for 30 min using Metamorph® software (version.7.7.5, Universal Imaging). Movies were processed to improve signal/noise ratio (equalize light, low pass and flatten background filters of Metamorph® software).

Acknowledgements

We thank Phong Tran for critical reading of the manuscript, Emmanuelle Neuman for assistance in electronic microscopy, as well as Andrei Popov and Isabelle Arnal for providing XMAP215 and H2 during preliminary experiments.

Abbreviations List

MT: microtubules

MAP: microtubule associated protein

TIRF: total internal reflexion fluorescence

Ase1: anaphase spindle elongation 1

Klp2: kinesin like protein 2

BRB80: Brinkley Buffer 80

SEM: standard error mean

References

- Azioune, A., N. Carpi, Q. Tseng, M. Théry, and M. Piel. 2010. Protein micropatterns: A direct printing protocol using deep UVs. *Methods in cell biology*. 97:133–46.
- Azioune, A., M. Storch, M. Bornens, M. Théry, and M. Piel. 2009. Simple and rapid process for single cell micro-patterning. *Lab on a chip*. 9:1640–2.
- Bartolini, F., and G.G. Gundersen. 2006. Generation of noncentrosomal microtubule arrays. *Journal of cell science*. 119:4155–63.
- Bieling, P., I. a Telley, and T. Surrey. 2010. A minimal midzone protein module controls formation and length of antiparallel microtubule overlaps. *Cell*. 142:420–32.
- Braun, M., D.R. Drummond, R. a Cross, and A.D. McAinsh. 2009. The kinesin-14 Klp2 organizes microtubules into parallel bundles by an ATP-dependent sorting mechanism. *Nature cell biology*. 11:724–30.
- Braun, M., Z. Lansky, G. Fink, F. Ruhnow, S. Diez, and M.E. Janson. 2011. Adaptive braking by Ase1 prevents overlapping microtubules from sliding completely apart. *Nature Cell Biology*. 13:1259–1264.
- Carazo-Salas, R.E., C. Antony, and P. Nurse. 2005. The kinesin Klp2 mediates polarization of interphase microtubules in fission yeast. *Science (New York, N.Y.)*. 309:297–300.
- Van Damme, D., K. Van Poucke, E. Boutant, C. Ritzenthaler, D. Inzé, and D. Geelen. 2004. In vivo dynamics and differential microtubule-binding activities of MAP65 proteins. *Plant physiology*. 136:3956–67.
- Dinarina, A., C. Pugieux, M.M. Corral, M. Loose, J. Spatz, E. Karsenti, and F. Nedelec. 2009. Chromatin shapes the mitotic spindle. *Cell*. 138:502–13.
- Fache, V., J. Gaillard, D. Van Damme, D. Geelen, E. Neumann, V. Stoppin-Mellet, and M. Vantard. 2010. Arabidopsis kinetochore fiber-associated MAP65-4 cross-links microtubules and promotes microtubule bundle elongation. *The Plant cell*. 22:3804–15.
- Fink, G., L. Hajdo, K.J. Skowronek, C. Reuther, A. a Kasprzak, and S. Diez. 2009. The mitotic kinesin-14 Ncd drives directional microtubule-microtubule sliding. *Nature cell biology*. 11:717–23.
- Furuta, K., and Y.Y. Toyoshima. 2008. Minus-end-directed motor Ncd exhibits processive movement that is enhanced by microtubule bundling in vitro. *Current biology : CB*. 18:152–7.
- Hackney, D.D., and W. Jiang. 2001. Assays for kinesin microtubule-stimulated ATPase activity. *Methods In Molecular Biology Clifton Nj*. 164:65–71.
- Holy, T.E., M. Dogterom, B. Yurke, and S. Leibler. 1997. Assembly and positioning of microtubule asters in microfabricated chambers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:6228–6231.
- Hyman, A., D. Drechsel, D. Kellogg, S. Salsler, K. Sawin, P. Steffen, L. Wordeman, and T. Mitchison. 1991. Preparation of modified tubulins. *Methods in Enzymology*. 196:478–85.
- Janson, M.E., R. Loughlin, I. Loiodice, C. Fu, D. Brunner, F.J. Nédélec, and P.T. Tran. 2007. Crosslinkers and motors organize dynamic microtubules to form stable bipolar arrays in fission yeast. *Cell*. 128:357–68.
- Jiang, K., and A. Akhmanova. 2011. Microtubule tip-interacting proteins: a view from both ends. *Current opinion in cell biology*. 23:94–101.

- Kapitein, L.C., E.J.G. Peterman, and B.H. Kwok. 2005. The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks. *Nature*. 435:114–118.
- Laan, L., N. Pavin, J. Husson, G. Romet-Lemonne, M. van Duijn, M.P. López, R.D. Vale, F. Jülicher, S.L. Reck-Peterson, and M. Dogterom. 2012. Cortical Dynein Controls Microtubule Dynamics to Generate Pulling Forces that Position Microtubule Asters. *Cell*. 148:502–514.
- Li, H., T. Mao, Z. Zhang, and M. Yuan. 2007. The AtMAP65-1 cross-bridge between microtubules is formed by one dimer. *Plant & cell physiology*. 48:866–74.
- Loiodice, I., J. Staub, T.G. Setty, N.T. Nguyen, A. Paoletti, and P.T. Tran. 2005. Ase1p Organizes Antiparallel Microtubule Arrays during Interphase and Mitosis in Fission Yeast □. *Molecular Biology of the Cell*. 16:1756–1768.
- Loughlin, R., B. Riggs, and R. Heald. 2008. SnapShot: motor proteins in spindle assembly. *Cell*. 134:548–548.e1.
- Loughlin, R., J.D. Wilbur, F.J. McNally, F.J. Nedelec, and R. Heald. 2011. Katanin Contributes to Interspecies Spindle Length Scaling in *Xenopus*. *Cell*. 147:1397–1407.
- Malekzadeh-Hemmat, K., P. Gendry, and J.F. Launay. 1993. Rat pancreas kinesin: identification and potential binding to microtubules. *Cellular and molecular biology NoisyleGrand France*. 39:279–285.
- Meng, Q., J. Du, J. Li, X. Lü, X. Zeng, M. Yuan, and T. Mao. 2010. Tobacco microtubule-associated protein, MAP65-1c, bundles and stabilizes microtubules. *Plant molecular biology*. 74:537–47.
- Mimori-Kiyosue, Y. 2011. Shaping microtubules into diverse patterns: molecular connections for setting up both ends. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*. 68:603–18.
- Nedelec, F., T. Surrey, S. Leibler, and A.C. Maggs. 1997. Self-organization of microtubules and motors. *Nature*. 389:305–308.
- Reymann, A.-C., R. Boujemaa-Paterski, J.-L. Martiel, C. Guérin, W. Cao, H.F. Chin, E.M. De La Cruz, M. Théry, and L. Blanchoin. 2012. Actin network architecture can determine myosin motor activity. *Science (New York, N.Y.)*. 336:1310–4.
- Reymann, A.-C., J.-L. Martiel, T. Cambier, L. Blanchoin, R. Boujemaa-Paterski, and M. Théry. 2010. Nucleation geometry governs ordered actin networks structures. *Nature materials*. 9:827–32.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor laboratory press. Cold Spring Harbor.
- Sasabe, M., and Y. Machida. 2006. MAP65: a bridge linking a MAP kinase to microtubule turnover. *Current opinion in plant biology*. 9:563–70.
- Shang, W., D.E. Crone, H. Yang, J.S. Dordick, R.E. Palazzo, and R.W. Siegel. 2009. Using centrosome fragments in the directed assembly of microtubules. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 9:871–875.
- Sharp, D.J., G.C. Rogers, and J.M. Scholey. 2000. Microtubule motors in mitosis. 41–47.
- Shelanski, M.L. 1973. Chemistry of the filaments and tubules of brain. *The journal of histochemistry and cytochemistry official journal of the Histochemistry Society*. 21:529–539.
- Subramanian, R., E.M. Wilson-Kubalek, C.P. Arthur, M.J. Bick, E. a Campbell, S. a Darst, R. a Milligan, and T.M. Kapoor. 2010. Insights into antiparallel microtubule crosslinking by PRC1, a conserved nonmotor microtubule binding protein. *Cell*. 142:433–43.

- Surrey, T., F. Nedelec, S. Leibler, and E. Karsenti. 2001. Physical properties determining self-organization of motors and microtubules. *Science*. 292:1167–1171.
- Théry, M. 2010. Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions. *Journal of cell science*. 123:4201–13.
- Tran, P.T., L. Marsh, V. Doye, S. Inoué, and F. Chang. 2001. A Mechanism for Nuclear Positioning in Fission Yeast Based on Microtubule Pushing 7. 153:397–411.
- Tulin, A., S. McClerkin, Y. Huang, and R. Dixit. 2012. Single-Molecule Analysis of the Microtubule Cross-Linking Protein MAP65-1 Reveals a Molecular Mechanism for Contact-Angle-Dependent Microtubule Bundling. *Biophysical Journal*. 102:802–809.
- Walczak, C.E., and S.L. Shaw. 2010. A MAP for bundling microtubules. *Cell*. 142:364–7.
- Walczak, C.E., I. Vernos, T.J. Mitchison, E. Karsenti, and R. Heald. 1998. A model for the proposed roles of different microtubule-based motor proteins in establishing spindle bipolarity. *Current Biology*. 8:903–913.
- Walker, R.A., O. Brien, K. Pryer, M.E. Soboeiro, W.A. Voter, H.P. Erickson, and E.D. Salmon. 1988. Dynamic Instability of Individual Microtubules. *The Journal of cell biology*. 107:1437–1448.
- Wordeman, L. 2011. How Kinesin Motor Proteins Drive Mitotic Spindle Function: Lessons from Molecular Assays. *Seminars in cell & developmental biology*. 21:260–268.
- Yang, Y., P. a Deymier, L. Wang, R. Guzman, J.B. Hoying, H.J. McLaughlin, S.D. Smith, and I.N. Jongewaard. 2006. Nucleation and growth of microtubules from gamma-tubulin-functionalized gold surfaces. *Biotechnology progress*. 22:303–12.

Figure Legends

Figure 1. Geometrical control of MT growth.

(A) Schematic representation of the micropatterning protocol.

(B) MT (green) growth out of dots and lines coated with micro-seeds (red). MTs are revealed by ATTO-488 tubulin and micro-seeds by ATTO-565 tubulin. Scale bar is 10 μm .

Figure 2. Control of MT orientation and polarity.

(A, B) Real time monitoring of MT growth out of a 3-micron-wide bar (A) and a 3-micron-wide dot (B). Angular distribution of MTs is represented by the proportion of MTs in every 10° wide angular sectors. On the bar micropattern, MT orientations appeared biased orthogonally to the longitudinal axis of the bar (A); and on the dot micropattern, orientations were radial and appeared evenly distributed through 360° (B). Distribution of MTs growth speed (left) displayed two separated Gaussian populations corresponding to the minus ends growth speed from 0 to 0.7 $\mu\text{m}/\text{min}$ (red) and the plus end growth speed from 0.8 to 2.2 $\mu\text{m}/\text{min}$ (green). (C) The relative proportions of MTs plus-ends and minus-ends (right) are calculated from this distribution (mean +/- sem).

Figure 3. Dynamic regulation of antiparallel MT bundle formation by Ase1 and Klp2.

(A) Representative images showing 9 distinct pairs of aster-like structures in the absence of MAPs. MTs were revealed by ATTO-488 tubulin. (B-E) Time lapse imaging in TIRF microscopy of MT interaction in the absence of MAPs (B), in the presence of 5 nM of Klp2 (C), 33 nM of Ase1 (D) or both (E). MTs forming anti-parallel bundles are highlighted in red. Scale bars represent 10 μm .

Figure 4. Quantification of antiparallel MT bundle formation by Ase1 and Klp2.

(A) Images of MTs, revealed by ATTO-488 tubulin, were taken after 30 min of polymerization, then overlaid and averaged. Averaged image color-coding ("FIRE" look-up table) reveals the most frequent structures in orange/yellow (right). (B) Averaged images were obtained in the control condition (without MAPs), in presence of 33 nM of Ase1, in presence of 5 nM of Klp2 and in presence of both. (C) Linescans of fluorescence intensity along the midline separating the two asters. Fluorescence peaks revealed the formation of a broad distribution of stable bundles by Ase1 and a sharper distribution of aligned bundles by the combination of Ase1 and Klp2.

Figure 5. Distance between asters regulates the number of anti-parallel MT bundles.

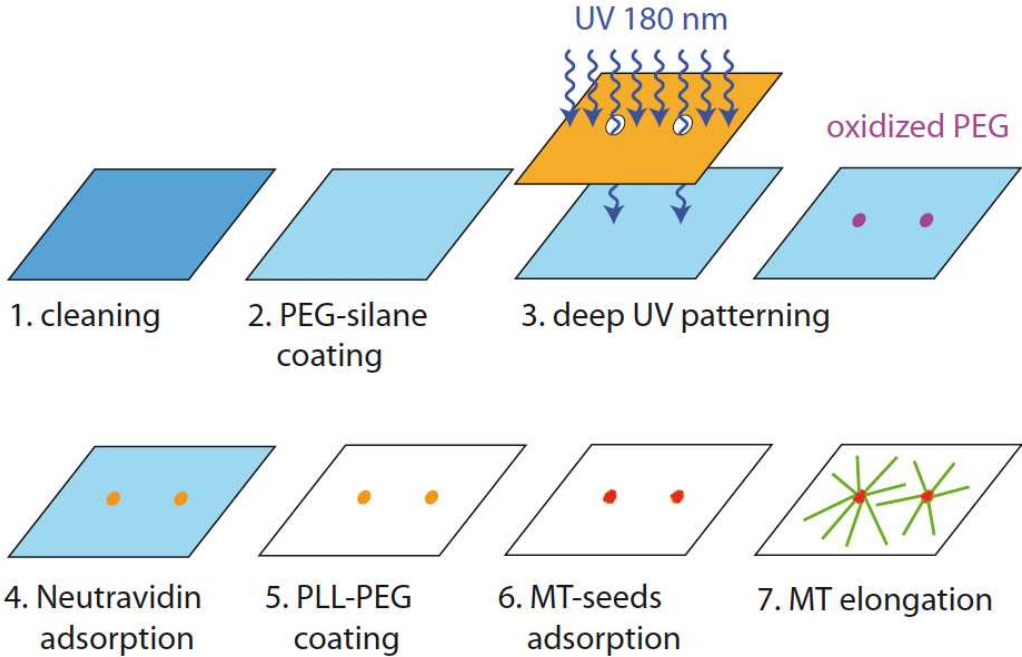
(A) Averaged images were obtained in control conditions (without MAPs) and in presence of 33 nM of Ase1 for two different distances between disk micro-patterns: 15 μm and 30 μm . Averaged image color-coding (“FIRE” look-up table) revealed the most frequent structures in orange/yellow (right). (B) Angular distributions of fluorescence intensity along the midline separating the two asters. The scheme on the right represents the linescan and the angle measure. Fluorescence peaks revealed that more bundles are formed as the asters become closer, and that Ase1 favors their assembly in both conditions. (C) Ase1 fluorescence signal along the linescan normalized with the signal in control conditions. The plot shows no differences in the angular variations of Ase1 bundling efficiency between short and long spindles.

Figure 6. Ase1 and Klp2 contribution to anti-parallel bundle formation

Schematic representation of antiparallel bundle formation without MAPs (control), with a crosslinker (Ase1), with a molecular motor (Klp2) and with both. In control conditions, MTs can co-align to form an anti-parallel bundle but they rapidly depolymerize and disappear. In the presence of Klp2, MTs are aligned along the central axis connecting the two nucleation regions but these antiparallel bundles eventually depolymerize or detach from one pole before being transported to the opposite pole. In presence of Ase1, antiparallel MTs bundles are crosslinked and therefore protected from depolymerization in a wide angular sector. In the presence of both Ase1 and Klp2, MTs are aligned and then form stable anti-parallel bundles along the central axis.

Figure 1

A



B

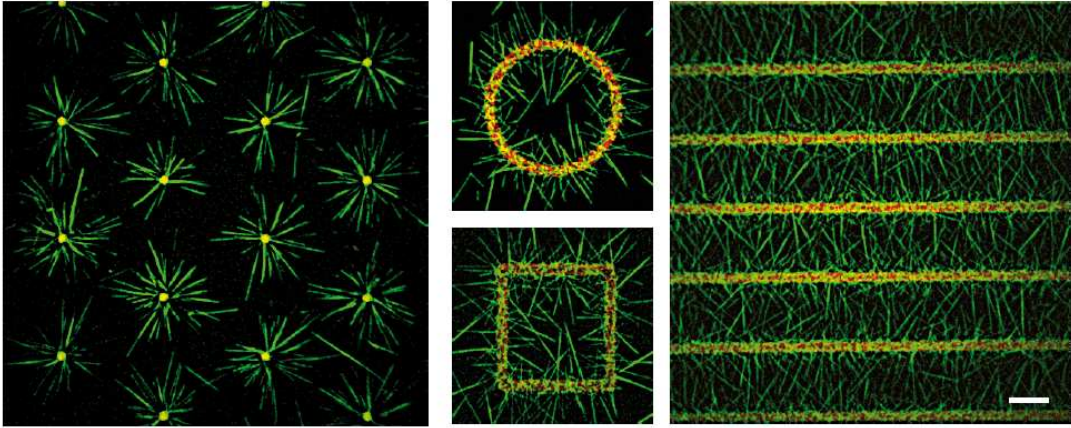


Figure 2

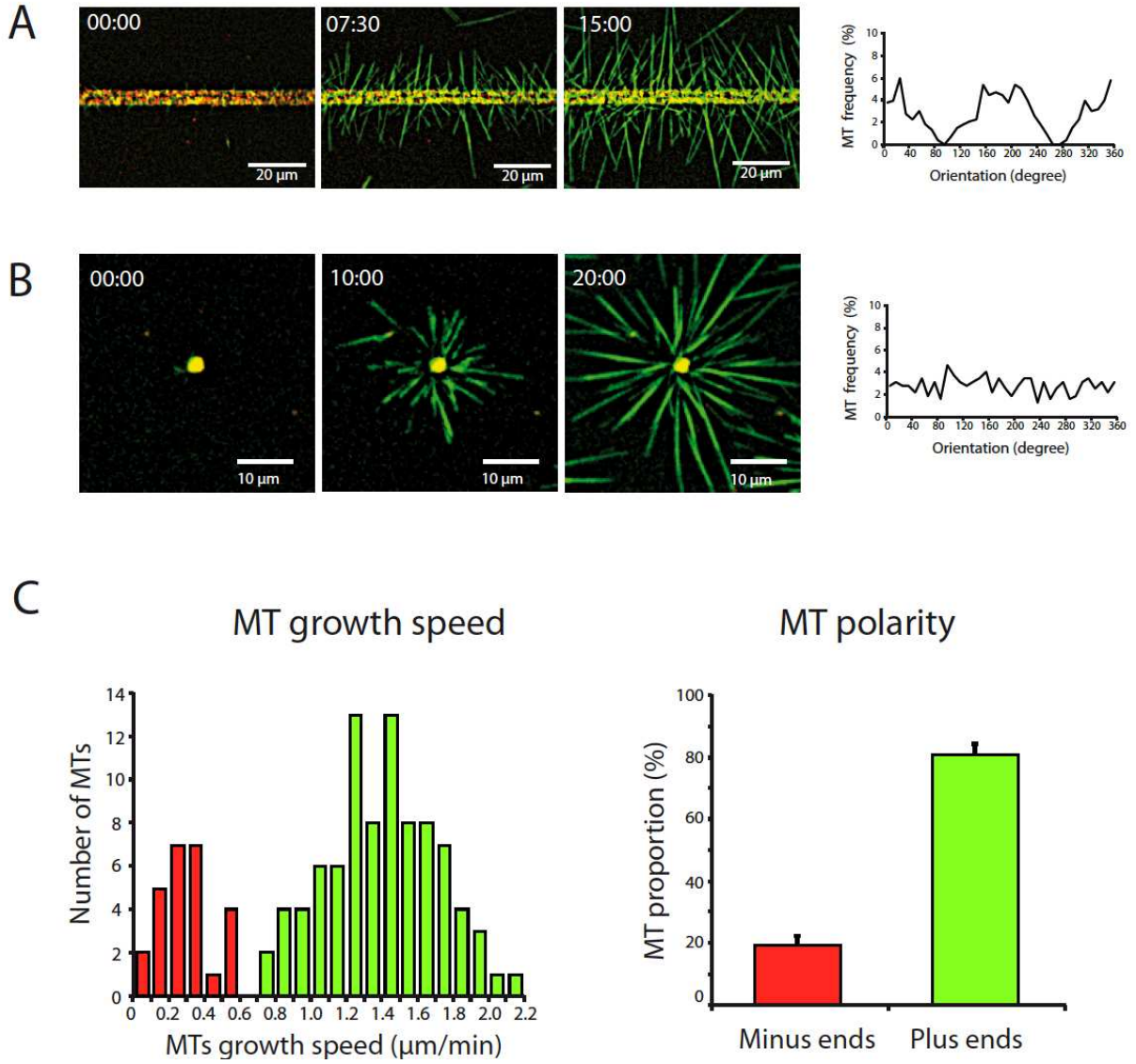


Figure 3

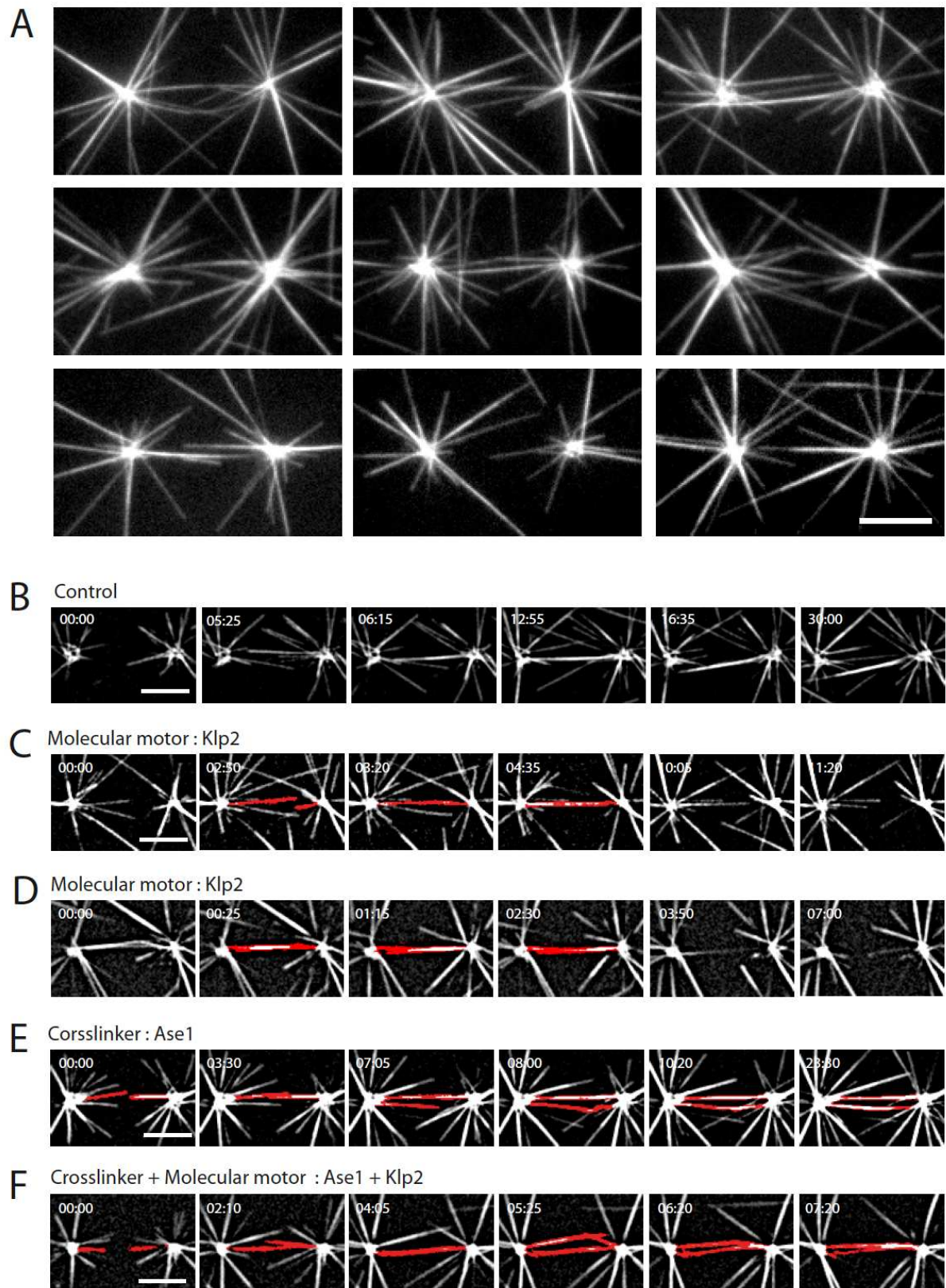


Figure 5

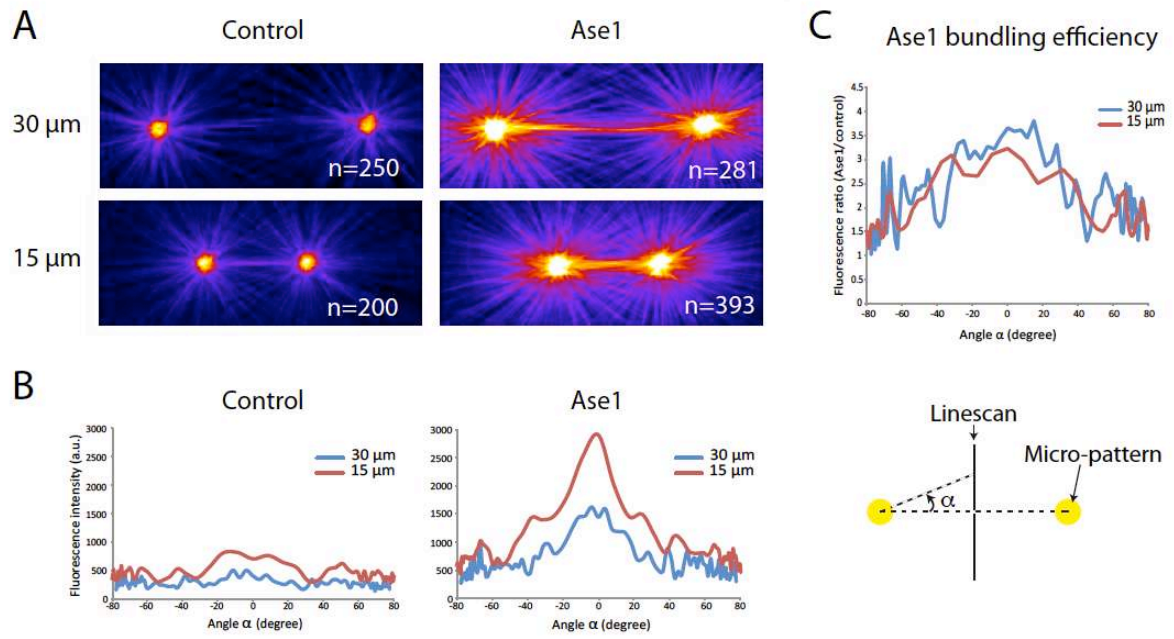
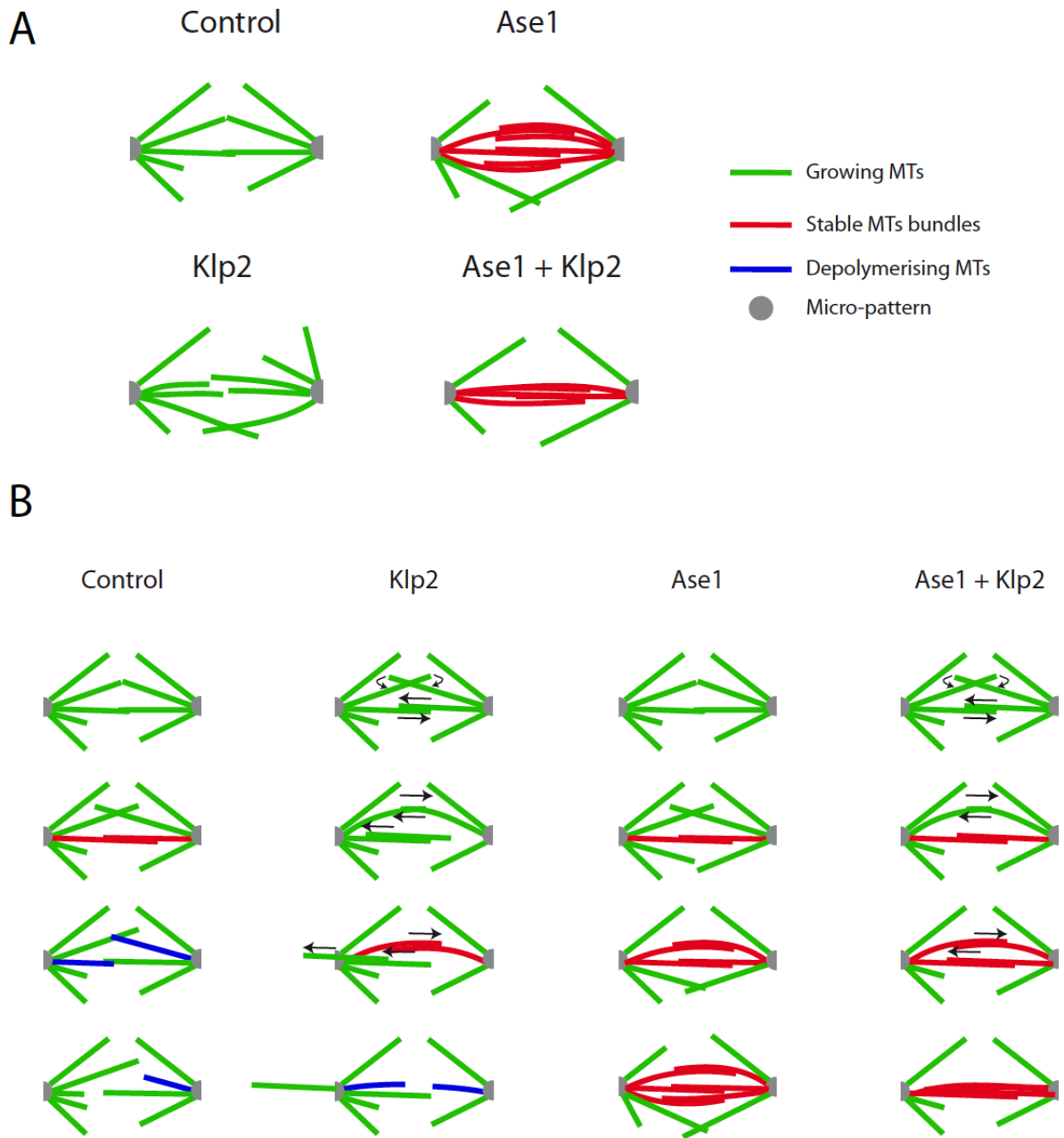


Figure 6



Quantification of MAPs and molecular motor activities on geometrically controlled microtubule networks

Didier Portran¹, Jeremie Gaillard¹, Marylin Vantard¹, Manuel Theyry¹

Online supplemental material

Three supplemental figures

Six supplemental movies

Supplemental Figures

Figure S1. **Micro-seeds formation.**

(A) Schematic representation of the experimental procedure to assemble stabilized MT micro-seeds. (B) Negative staining electronic microscopy images of stabilized MT micro-seeds. Scale bar represents 100 nm.

Figure S2. **Orientation and polarity of MTs nucleated from long MT seeds.**

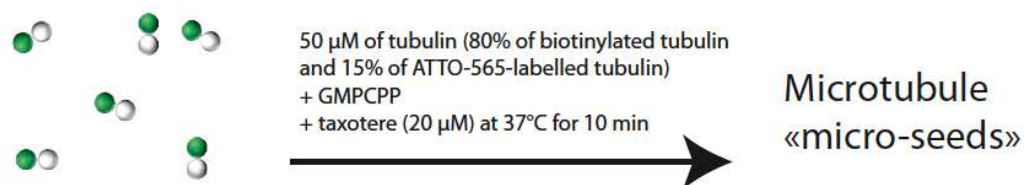
(A) Schematic illustration of the difference between long and micro-seeds orientations by fluid flow during their grafting on the micropatterned regions. (B) MT growth out of a 3-micron wide dot and a 3-micron wide line coated with long (2-5 μm) MT seeds. MTs are revealed by ATTO-488 tubulin. (C) Angular distributions of MTs revealed the biased MT distribution on both the bar and the dot. (D) Distribution of MTs growth speed (left) displayed two separated Gaussian populations corresponding to the minus ends growth speed from 0 to 1.4 $\mu\text{m}/\text{min}$ (red) and the plus end growth speed from 1.4 to 3.5 $\mu\text{m}/\text{min}$ (green). The threshold differs with the experiment displayed in figure 2 since the tubulin concentration is 22 μM instead of 15 μM . The relative proportions of MTs plus-ends and minus-ends (right) are calculated from this distribution. Less than 60% of the MTs have their minus-end on the micropattern.

Figure S3. Purification and characterization of Ase1 and Klp2.

(A) Coomassie-stained SDS-PAGE gel of the purified recombinant His-Ase1 and SNAP-Klp2-His expressed in *E. coli*. (B) Control of MT bundling efficiency of recombinant His-Ase1 in fluorescent microscopy: GMPCP stabilized MTs labeled with ATTO-565 were incubated in presence or absence of 50 nM His-Ase1. (C, D) Apparent K_d of Ase1 (C) and Klp2 (D). The amount of His-Ase1-GFP and SNAP⁵⁶⁵-Klp2-His bound to MTs is plotted as a function of total tubulin concentration. The apparent K_d was calculated to be 41 ±7 nM for Ase1 and 72 ±5.8 nM for Klp2. (E) Steady-state ATPase activity of full-length recombinant SNAP-Klp2-His for three different concentrations (50, 100 and 250 nM) in presence of 2.5 μM of taxol-stabilized MTs. A $V_{\max} = 1.1s^{-1}$ was calculated. (F) To control Klp2 activity, sliding between two growing free MTs in presence of 15 μM of tubulin (30% ATTO-488-labelled tubulin and 70% unlabeled tubulin), 5 nM of SNAP-Klp2-His and 1 mM ATP/GTP was analyzed. We observe the co-alignment of two MTs (arrows) that slide until they separate from each other. They are observed in time-lapse TIRF microscopy. Scale bars represent 10 μm.

Figure S1

A



B

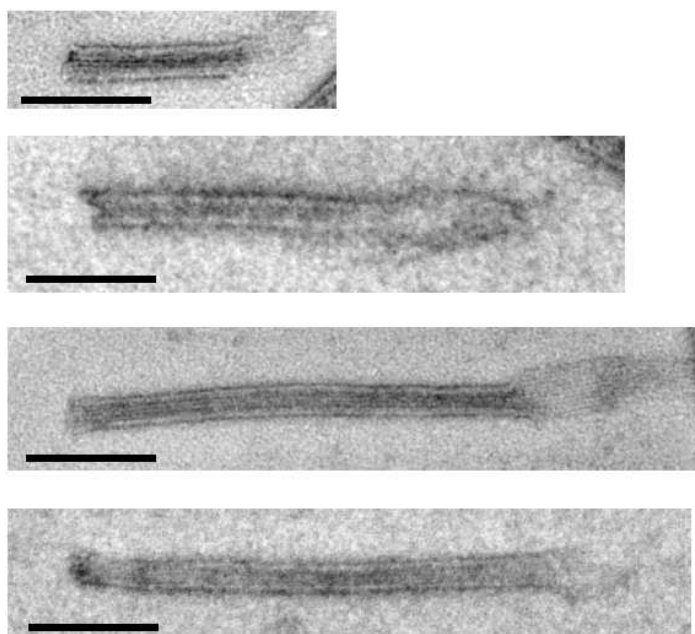
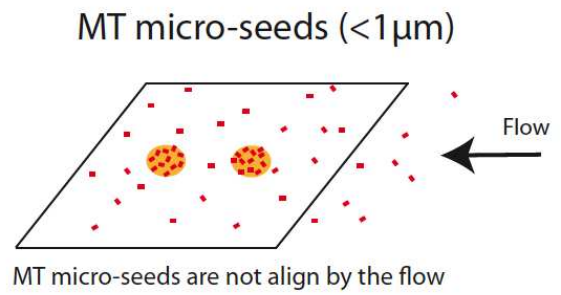
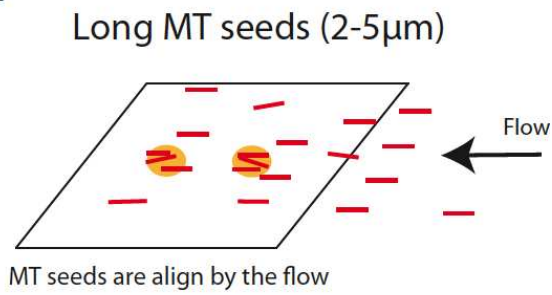
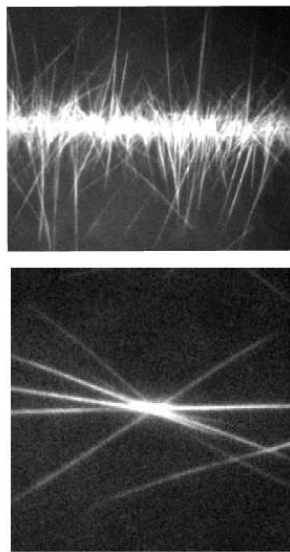


Figure S2

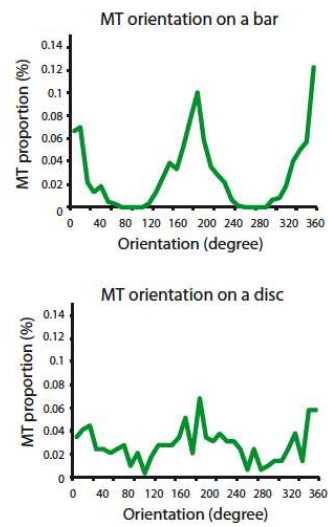
A



B



C



D

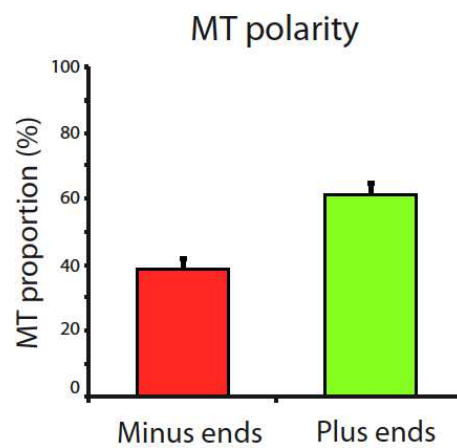
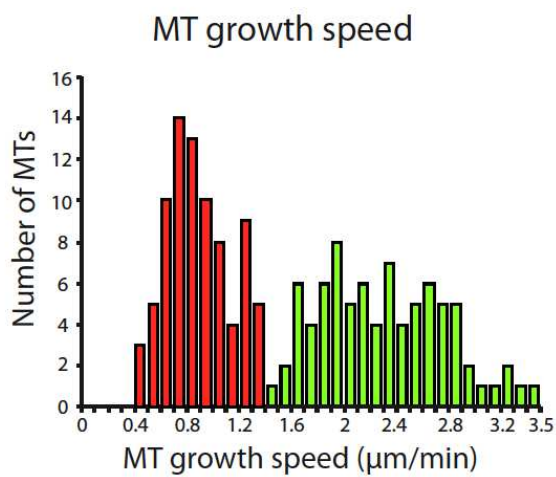
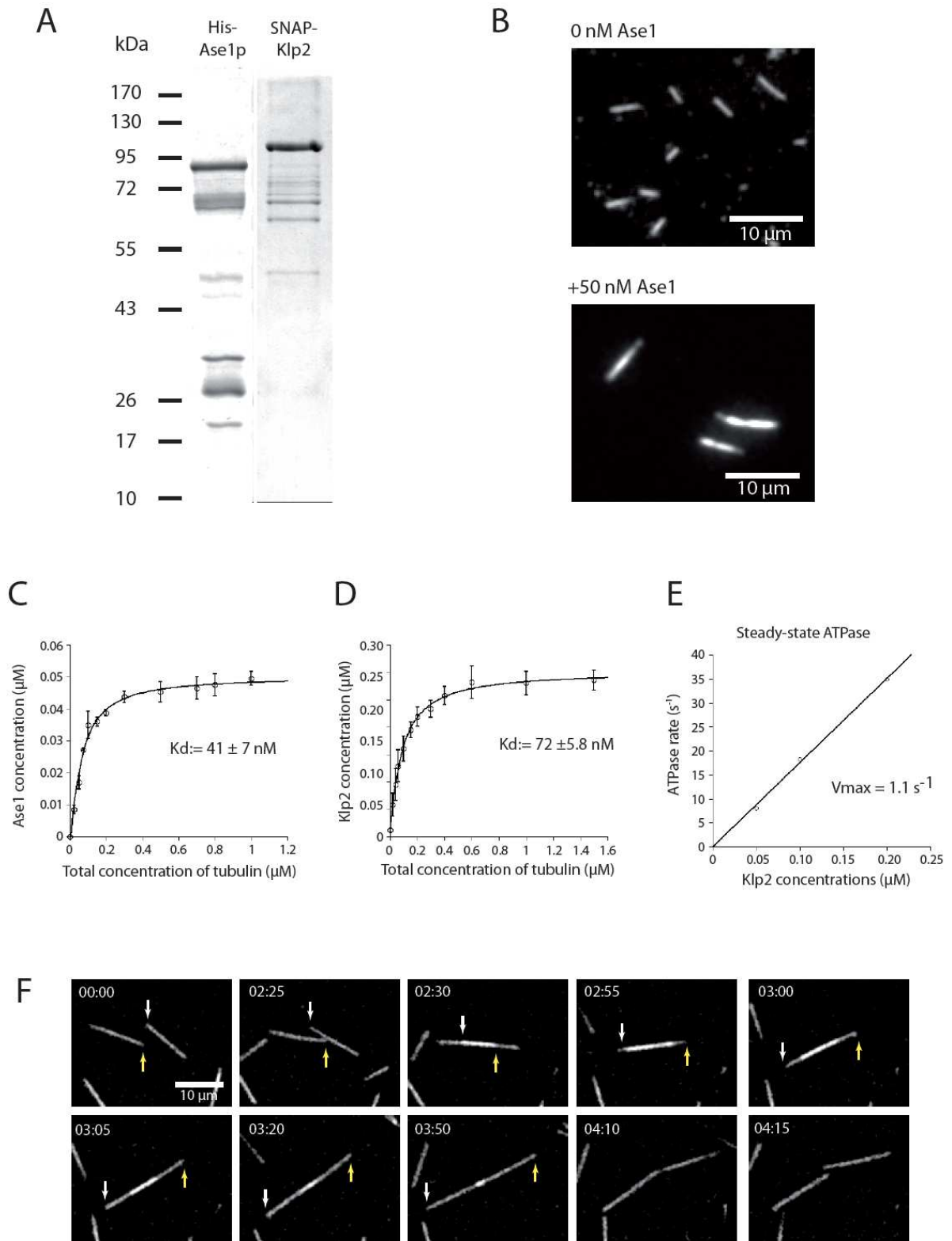


Figure S3



Supplemental Movies

Movie S1: **MT nucleation on disc array**

Time-lapse images in TIRF microscopy of MTs polymerizing in presence of 15 μ M of tubulin (30% ATTO-488-labelled tubulin and 70% unlabeled tubulin) (green) from an array of discs. MT seeds are polymerized with ATTO⁵⁶⁵ labelled tubulin (red). Frames are taken every 5 seconds. Scale bar: 20 μ m.

Movie S2: **MT nucleation on two discs.**

Time-lapse images in TIRF microscopy of MTs polymerizing in presence of 15 μ M of tubulin (30% ATTO-488-labelled tubulin and 70% unlabeled tubulin) (green) from two micro-patterned discs separated by 20 μ m. MT seeds are polymerized with ATTO⁵⁶⁵ labelled tubulin (red). Frames are taken every 5 seconds. Scale bar: 10 μ m.

Movie S3: **MT nucleation on two discs in the presence of Klp2.**

Time-lapse images in TIRF microscopy of MTs polymerizing in presence of 15 μ M of tubulin (30% ATTO-488-labelled tubulin and 70% unlabeled tubulin) (green) and in the presence of 5 nM of Klp2 from two micro-patterned discs separated by 20 μ m. MT seeds are polymerized with ATTO⁵⁶⁵ labelled tubulin (red). Frames are taken every 5 seconds. Scale bar: 10 μ m.

Movie S4: **MT nucleation and sliding apart in the presence of Klp2.**

Time-lapse images in TIRF microscopy of MTs polymerizing in presence of 15 μ M of tubulin (30% ATTO-488-labelled tubulin and 70% unlabeled tubulin) (green) and in the presence of 5 nM of Klp2 from two micro-patterned discs separated by 20 μ m. MT seeds are polymerized with ATTO⁵⁶⁵ labelled tubulin (red). Frames are taken every 5 seconds. Scale bar: 10 μ m.

Movie S5: **MT nucleation on two discs in the presence of Ase1.**

Time-lapse images in TIRF microscopy of MTs polymerizing in presence of 15 μ M of tubulin (30% ATTO-488-labelled tubulin and 70% unlabeled tubulin) (green) and in presence of 33 nM of Ase1 from two micro-patterned discs separated by 20 μ m. MT seeds are polymerized with ATTO⁵⁶⁵ labelled tubulin (red). Frames are taken every 5 seconds. Scale bar: 10 μ m.

Movie S6: **MT nucleation on two discs in the presence of Ase1 and Klp2.**

Time-lapse images in TIRF microscopy of MTs polymerizing in presence of 15 μ M of tubulin

(30% ATTO-488-labelled tubulin and 70% unlabeled tubulin) (green) and in presence of both 33 nM of Ase1 and 5 nM of Klp2. MTs polymerized from two micro-patterned discs separated by 20 μm . MT seeds are polymerized with ATTO⁵⁶⁵ labelled tubulin (red). Frames are taken every 5 seconds. Scale bar: 10 μm .

iii. Conclusions et perspectives

Au cours de cette étude nous avons montré qu'*in vitro*, Ase1 et Klp2 agissent en synergie afin de constituer des faisceaux de MTs anti-parallèles stables. Nous avons observé qu'Ase1 stabilise l'interaction entre les MTs interdigités et anti-parallèles entre deux asters. Nous avons aussi montré que Klp2 réorganise les MTs en faisceaux anti-parallèles mais ne les stabilise pas ou peu. Les MTs peuvent alors soit dépolymériser, soit être transportés ce qui conduit à la disparition du faisceau. Lorsque l'on ajoute les deux protéines dans le système on observe une stabilisation et une réorientation des MTs en faisceaux anti-parallèles entre les deux asters. Ces deux protéines et leurs actions synergiques permettent la mise en place et la persistance dans le temps des faisceaux anti-parallèles de MTs *in vitro*.

Ces données sont en accord avec ce qui a déjà été proposé dans la littérature tant *in vivo* qu'*in vitro*. En effet, Ase1 a été décrit comme pouvant organiser les MTs de façon anti-parallèle et les co-aligner à différents angles (Janson et al., 2007). Klp2 a été décrit pour organiser les MTs en faisceaux et les faire glisser les uns par rapport aux autres, lorsqu'ils sont organisés de façon anti-polaires (Brawn et al., 2009 ; Surrey et al., 2001). Le freinage adaptatif de Klp2 par Ase1, décrit par Brawn et al (2011) montre qu'il existe une synergie dans l'activité de ces deux protéines associées aux MTs. Dans cette étude, nous avons montré l'effet des deux protéines *in vitro* sur l'organisation des MTs sous contraintes géométriques. Ces données nous permettent de confirmer leurs rôles respectifs dans l'auto-organisation de réseaux de MTs anti-polaires ainsi que leur action synergique et de valider la méthode de micro-patterning pour l'étude de l'assemblage de réseaux de MTs.

La technique de micro-patterning mise au point permet également l'étude de différentes configurations de réseaux de MTs en fonction de la forme du micro-pattern. En effet, ce dispositif expérimental pourrait permettre par exemple, la dissection du fuseau mitotique en sous-modules (i.e. midzone), et l'étude de l'implication d'autres MAPs ou moteurs moléculaires dans l'organisation de tels réseaux. Outre l'étude de l'organisation de la midzone que j'ai initié au laboratoire, une étude en collaboration avec Ariane Abrieux (LGBM, Montpellier) va également débuter dans l'équipe afin de reconstituer d'autres sous-modules mitotiques.

b. MAP65-1/Ase1 increase microtubule flexibility

i. Introduction

Le but de la seconde partie de mon projet de thèse a été d'étudier le rôle de MAP65-1 dans la formation de faisceaux de MTs *in vitro*. Au moment où j'ai débuté ce sujet de recherche, les propriétés de co-alignement des MTs par cette MAP65 étaient méconnues. Pour cette étude, j'ai dans une première étape, amélioré le dispositif expérimental permettant la visualisation de rencontres entre MTs en microscopie TIRF (Fache et al., 2010). Comme pour la technologie de micro-patterning, j'ai utilisé une double passivation de la surface en verre avec du silane-PEG-biotine et PLL-PEG pour la lamelle et du silane-PEG et PLL-PEG pour la lame. Ce protocole m'a permis d'obtenir une surface réduisant fortement l'adsorption non spécifique de la tubuline et des MAPs. J'ai ainsi pu disposer d'un système d'observation reproductible et fiable.

Les MTs corticaux dans les cellules d'hypocotyles *d'Arabidopsis Thaliana*, tout comme ceux observés *in vitro* en présence de MTs et de MAP65-1 montrent de fortes déformations et courbures lorsqu'ils se co-alignent à des angles importants (jusqu'à 45°). Nous nous sommes donc demandé si, pour assembler efficacement un réseau de MTs en faisceaux, MAP65-1 ne devait pas moduler les propriétés mécaniques des MTs afin de les rendre plus flexibles. Dans le but de déterminer la L_p de MTs assemblés en présence de MAP, j'ai développé un dispositif expérimental qui vise à courber des MTs par un flux hydrodynamique en utilisant la technique de micro-patterning. La mesure de la courbure des MTs pour déterminer leur L_p a été réalisée en utilisant un modèle mathématique développé par Jean-Louis Martiel et Marcelo Zoccoler (étudiant en M2, sous la direction de Jean-Louis Martiel). J'ai privilégié cette technique à celles utilisant les fluctuations thermiques, car elle a l'avantage d'exercer une force directe sur la lattice du MTs et permet une mesure plus précise de la courbure des MTs.

Nous avons comparé les résultats obtenus avec Ase1 (*s.pombe*) l'orthologue de MAP65-1 chez la plante (*A.Thaliana*) afin de voir si l'on a une conservation des mécanismes d'organisation des MTs en faisceaux entre ces organismes. Contrairement aux mammifères et aux levures qui n'ont qu'une seule MAP65, les plantes en ont plusieurs. Elles sont localisées dans les cellules avec des populations différentes de MTs. Aussi, dans le cadre de cette étude, nous avons étudié un autre membre de la famille des MAP65s chez *arabidopsis thaliana* récemment caractérisé dans notre laboratoire, la MAP65-4 et comparé avec les données obtenues avec MAP65-1. MAP65-4 se localise *in vivo* sur les fibres kinétochoriennes et

organise les MTs en faisceaux *in vitro* différemment de ceux créés par MAP65-1 (Fache et al., 2010, Gaillard et al., 2008).

ii. Résumé de l'article de thèse

Dans les cellules eucaryotes, la majorité des réseaux de MTs acentrosomaux sont formés de faisceaux de MTs. Bien que les mécanismes responsables de l'organisation des MTs en faisceaux ne soient pas totalement compris, certaines étapes clés ont été décrites dans la littérature. Elles incluent la nucléation de MTs suivie de leur relargage et de leur transport dans le cytoplasme par des moteurs moléculaires ou *via* le mécanisme de « treadmilling ». Des observations réalisées dans des cellules de plantes ont montré que les rencontres entre les MTs mobiles et des MTs stables (résidents) à des angles compris entre 0 et 40° conduisent à leur co-alignement. Les MTs étant des structures rigides qui doivent être localement déformés pour se co-aligner à de tels angles, nous avons recherché dans notre étude si les protéines de la famille des MAP65s modifient leurs propriétés mécaniques.

Dans une première étape, nous avons induit la formation de faisceaux de MTs en présence de MAP65-1/Ase1 dans un système biomimétique. Les évènements de rencontre entre les MTs sont suivis en microscopie TIRF. Nos données montrent qu'en présence de ces deux MAP65s, les MTs, lorsqu'ils se rencontrent à des angles allant jusqu'à 45°, se co-alignent avec une polarité opposée. Pour mesurer la rigidité des MTs dynamiques en présence des MAP65-1/Ase1 nous avons quantifié leur longueur de persistance (L_p). Nous avons démontré que les MAP65-1/Ase1 rendent les MTs individuels plus flexibles. Elles diminuent aussi la rigidité globale des faisceaux de MTs. L'interaction entre le domaine de liaison aux MTs (MBD) et la lattice du MT est directement responsable de cette augmentation de la flexibilité du MT. Cette étude nous a permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle la diminution de la flexibilité des MTs est un mécanisme qui contrôle la formation de réseaux de MTs en faisceaux dans les cellules eucaryotes.

Les résultats obtenus font l'objet d'une publication soumise, aussi leur description est donné dans le manuscrit ci-joint (Portran et al.).

Article de recherche 2

MAP65/Ase1 promote microtubule flexibility

D. Portran¹, M. Zoccoler¹, J. Gaillard¹, V. Stoppin-Mellet¹, E. Neumann², I Arnal³, J.L. Martiel¹, M. Vantard^{1*}

¹Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant (iRTSV), Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale UMR CNRS, CEA, INRA, Université Joseph Fourier, 38054 Grenoble, France

²Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, CNRS, CEA, Université Joseph Fourier, Grenoble 38027, France

³Institut de Neurosciences, INSERM, Université Joseph Fourier, La Tronche 38706, France

*Corresponding author : M Vantard, iRTSV/PCV, Bât 40/20, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France. Email : marylin.vantard@cea.fr

Key words: Microtubules, Flexibility, MAP65, Ase1

Abstract

Microtubules (MTs) are dynamic cytoskeletal elements involved in numerous cellular processes. While they are highly rigid polymers with a persistence length of 1-8 μm , they may exhibit curved shape at a scale of few micrometers within cells depending on their biological functions. However, how MT flexural rigidity in cells is regulated remains poorly understood. Here, we asked whether MT associated proteins (MAPs) could locally control the mechanical properties of MTs. We showed that two major cross-linkers of the conserved MAP65/PRC1/Ase1 family drastically decrease MT rigidity. Their MT-binding domain mediates this effect. Remarkably, the softening effect of MAP65 observed on single MTs is maintained when MTs are cross-linked. By reconstituting physical collisions between growing MTs/MT bundles, we further revealed that the decrease in MT stiffness induced by MAP65 proteins is responsible for the sharp bending deformations observed in cells when they co-align at steep angle in order to create bundles. Altogether this data provide new insights on how MAP65, by modifying MT mechanical properties may regulate the formation of complex MT arrays.

Introduction

Microtubules (MTs) are major components of the cytoskeleton involved in fundamental cellular processes. They are rigid, polar and dynamic elements that can polymerize and depolymerize at their both ends. The stochastic switching between growth and shortening phases is termed dynamic instability (1). In living cells, they form arrays that either radiate from structured MT organizing centers such as the centrosome or are self-organized into linear bundles that assume different configurations depending on the cell type (2). Within these arrays, MTs can be straight or highly curved (deformed MTs) presumably depending on the functions in which they are engaged (3, 4, 5, 6). An example of MT deformations that rely to biological functions in cells includes the formation of MT bundles. Indeed, to create bundles, physical collisions between MTs at angles up to 40° might result in their bending deformations in order for them to co-align (7, 3). Furthermore, beside individual MTs, small groups of MTs such as bundles may also assume deformations. In plant cells that display box-like geometry, with sharp edges marking the boundaries between adjacent faces, MT bundles wind around the cell cortex, and are thus deformed to adapt their organization to these physical constraints (8). In fission yeast, MT bundles deformations have also been observed in correlation with nucleus positioning (9). These observations suggest that in living cells, the

mechanical behavior of MTs/MT bundles is variable and must be locally regulated depending of the functions in which they are engaged. As MTs are highly rigid structures, with a persistence length of 1-8 mm for naked single MTs (10), one essential question is to understand how they can be deformed at a scale of a few micrometers. Up to now, although measurement of MT Lp is challenging *in vivo*, it has been estimated to be around 30 μm in animal culture cells (11). In these cells, MT bending was suggested to be due to forces exerted by actin filaments and myosin motors or MT molecular motors (5, 11, 12), all of which acting alone or together in the presence of thermal fluctuations (12). *In vitro*, studies have determined that MT Lp can be modulated by various factors, including MT assembly/disassembly rates (13), the nucleotide bound to tubulin (14), the length of MTs (15), and/or the protofilament number (16). Microtubule-Associated Proteins (MAPs) have also been suggested to alter MT flexibility. However, even though several types of MAPs have been extensively studied, only two of them have been reported to modify the MT flexural rigidity *in vitro*, namely the neuronal MAPs tau and MAP2 that stiffen them (14, 17). By contrast, increased flexibility of MTs by MAPs has never been described. In this study, to explore if MT deformations observed in living cells could be due to the presence of MAPs, we focused on MT cross-linkers since, as discussed above, MT deformations might be a key process in generating MT bundles in eukaryote cells (2, 18, 8).

Beside molecular motors, the major MAPs that have been reported so far to cross-link MTs in eukaryote cells are members of the conserved MAP65 family (19, 20, 21,22). Gene analysis revealed nine isoforms in the plant model *Arabidopsis thaliana* (MAP65-1 to -9) (23) and one in vertebrate (PRC1,22) and in yeast (Ase1, Schuyler et al., 2003). MAP65-1/Ase1 are associated with the cortical MTs during interphase (24, 16, 25, 26) and MAP65-1/Ase1/PRC1 play key roles in organizing anti-parallel MTs at the midzone during mitosis (19, 21, 22, 27, 28). To explore whether MAP65 modify MT mechanical properties, we developed an original assay based on MT micro-patterning method (29) and hydrodynamic flux. We demonstrate that MAP65-1/Ase1 drastically increase the flexibility of both single and cross-linked MTs. This effect is independent of MT dynamic changes and is directly mediated by MAP65 MT-binding domain. To validate whether the softening effect of MAP65 on MTs was determinant in creating bundles, we reconstituted physical collisions between growing MTs/MT bundles and revealed that the decrease in MT flexural rigidity mediated by MAP65/Ase1 is required to enable the bending and co-alignment of MTs at steep-angles. Altogether, these data provide new insights on how these key proteins, by modifying MT mechanical properties may control the issue of MT-MT encounters resulting in the formation

of complex MT bundle arrays. More generally, they suggest that MT softening by MAPs might represent a mechanism that could regulate the plasticity of MT networks in cells.

Results

MAP65-1/Ase1 increase the flexibility of individual MTs

To evaluate the effect of MAP65-1 and Ase1 on the MT bending stiffness, we measured the persistence length (L_p) of MTs growing in presence of these two MAP65. For that, we set up an assay in which fluorescent MTs elongate from seeds immobilized on a bar-shaped micro-patterned surface (29) and are bent by a hydrodynamic flow applied perpendicularly to the growing MTs (Figure 1A, movies 1 and 2).

To measure MT rigidity from flow-induced MT deformations, we adapted the equations for elastic filaments (30) and determine the MT persistence length using the best-fit solution to MT configuration (supplemental material). Results show that MTs growing in the absence of MAPs had a L_p of 1.58 ± 0.62 mm (Table 1, Figure 1B), which is consistent with previous reported values (10). In the presence of 100 nM MAP65-1 or Ase1 (with an apparent K_d of respectively 21 ± 2 and 41 ± 7 nM, Figure S1, A-B), the L_p decreased by a factor of 4 (0.39 ± 0.16 mm) and 3.2 (0.45 ± 0.18 mm) respectively (Table 1, Figure 1B, movie S2). This effect is concentration dependent and is already observed for 1 nM MAP65-1 (Figure 1C).

To investigate whether the increase in MT flexibility is unique to MAP65-1/Ase1, we next determined the effect of another member of the plant MAP65 family on MT L_p . Indeed, the plant MAP65 family, in contrary to mammals and yeast, contains several members (23). Among them, we chose MAP65-4, which associates with kinetochore fibers during mitosis and organizes MTs in bundles *in vitro*, but differently than MAP65-1: MAP65-4 is oriented perpendicularly to the MT lattice (compared to obliquely for MAP65-1) and co-aligns MTs with a 15 nm MT inter-spacing (compared to 30 nm for MAP65-1), (31, 32). In the presence of 100 nM MAP65-4 (apparent K_d of 19 ± 2 nM, Figure S1C), the MT L_p was 1.39 ± 0.47 mm, which is not significantly different from that for MTs in the absence of MAPs (Table 1, Figure 2B-C).

MAP65 MT-binding domain is required to modulate MT stiffness

We next examined the relative contribution of the functional domains of MAP65-1 to increase the MT flexibility. Indeed, MAP65-1, like other MAP65 family proteins, exhibits a C-terminal MT-binding domain and a N-terminal coiled-coil region required for its homo-dimerization (31, Figure 2A). The MT-binding domain is responsible for the preferential

antiparallel orientation of the bundled MTs whereas the projection domain length determines the MT inter-spacing (31, 33). Contrary to Ase1 and PRC1, MAP65-1 binds to MTs as a monomer and further dimerizes when encountering another MAP65-1 bound to an adjacent MT (31,33). At first, we generated a fragment carrying the MT-binding domain of MAP65-1 (named MAP65-1MBD, Figure 2A). MAP65-1(MBD), at a concentration of 100 nM (apparent Kd of $2.1\pm 4 \mu\text{M}$, Figure S1D), decreases the Lp of growing MTs compared to the control ($0.83\pm 0.34 \text{ mm}$ compared to $1.58\pm 0.62 \text{ nm}$, Table 1, Figure 2B-C), but with a lower efficiency than the full-length MAP65-1 ($0.39\pm 0.16 \text{ mm}$, Figure 1). This lower efficiency could be related to its lower MT-binding affinity (Kd 100-fold weaker than the full length MAP65-1) and/or the absence of the projection domain. We next generated chimeras with the MT-binding domain of MAP65-1 and the dimerization domain of MAP65-4 and *vice-versa* (referred to as Chimera 4-1 and Chimera 1-4, respectively) (Figure 2A). Chimera 4-1 hardly bundled MTs and could not be tested in this study, whereas Chimera 1-4 had an affinity for MTs similar to that of MAP65-1 and MAP65-4 (Figure S1E). In the presence of 100 nM Chimera 1-4, MT Lp is of $1.29\pm 2.42 \text{ mm}$, a value not significantly different from that in the absence of MAPs (Table 1, Figure 2B-C). Thus, Chimera 1-4, like MAP65-4, had no effect on MT rigidity. These data show that the MT binding domain of MAP65-1 mediates its MT softening effect.

MAP65-1/Ase1 increase MT-bundle flexibility

In order to determine whether MAP65-1/Ase1 were also able to modulate the global mechanical properties of cross-linked MTs, we compared the Lp of growing MT bundles generated by MAP65-1, Ase1, MAP65-4 and Chimera 1-4 (Figure 3, movies 3-4). We used the same experimental procedure as above, but MT seed bundles, instead of individual MT seeds, were immobilized on the micro-patterned surface (Figure 3A). To measure the bundle Lp, we did not consider bundles with more than three MTs as we could not ascertain that the number of cross-linked MTs was the same all along the bent growing bundle. At first, we focused on MAP65-4/Chimera1-4 that does not affect the mechanical properties of single MTs (Table 1). Results show that bundles composed of two MTs have a Lp of $3.49\pm 0.5 \text{ mm}$ (MAP65-4) and of $2.57\pm 0.6 \text{ mm}$ (Chimera1-4) respectively (Table 2, Figure 3C). For bundles having three MTs the Lp further increases up to 4.16 mm (MAP65-4) and 4.07 mm (Chimera1-4) (Table 2). In contrast, the rigidity of bundles assembled in presence of MAP65-1/Ase1 remains constant as the number of MTs increases from two to three (Lp= 1.3 mm (2 or 3 MTs) for MAP65-; Lp= 1.05 mm (2 MTs) and 1.16 mm (3 MTs) for Ase1) (Table 2).

The L_p of bundles is known to depend on three factors: (i) the orientation of the bundle with respect to the flow, (ii) the MT arrangement within the bundle and (iii) the length of the link between MTs, as illustrated in Figure S2 (a-f). Since we can hardly extract the two first informations from our experimental data, we computed the flexural rigidities of these different possible bundle configurations (Figure S2 and Supplemental methods). First, we assumed that MTs are linearly arranged arrayed inside bundles with a relative orientation with respect to the flow given by configurations (a) and (c) in Figure S2. For these bundles, the predicted stiffness scales linearly with the number of MTs, as indicated in Figure S2 (a, c). This is consistent with the L_p that we measured for bundles induced by MAP65-4 and Chimera 1-4 (Table 2). However, for bundles induced by MAP65-1 and Ase1, we measured a L_p which is constant and independent on the number of MTs in the bundle (Table 2). This indicate that the softening effect of these two MAP65 on single MTs is maintained when they are bundled. Second, we turned to the other possible configurations of MTs in the bundles (Figure S2 b, d-f) for which one predicts large stiffness. Since we we did not observe a large variability of bundle L_p in our measurements, we conclude that these configurations are less likely to happen, thereby indicating that configurations (a) and (c) are favored by our experimental setup.

Encountering events

To investigate whether the MT-softening effect of MAP65-1/Ase1 was determinant in creating bundles, we reconstituted physical collisions between single growing MTs using a biomimetic system and TIRF microscopy (Figure 4A, movie 5). We were able to mimic the MT collision events observed in living cells (7, 34), i.e cross-over, touch-and-run and bundling (Figure S3, movies 6-8). The frequency of each of these outcomes in the presence of MAP65-1/Ase1 was determined in function of MT collision angles and MT polarity (Figures 4, S3). The MT bundling was restricted to anti-parallel MTs that encounter at angle up to 45° in agreement with previous observations (25, 31, 33) and resulted in a sharp bend of the incident MTs at the site of the collision (Figures 4B-C, S3). In contrast, in presence of MAP65-4, MTs were not able to bundle MTs at angle collision $>22^\circ$ (Figure 4C). Below this value, bundling occurred whatever the polarity of MTs, in agreement with previous data demonstrating the non-selectivity of MAP65-4 for MT polarity (32). Overall, these results show that the ability of MAP65-1 and Ase1 to decrease the flexural rigidity of dynamic MTs is related to their MT bundling efficiency at steep angles. In line with the softening effect of

MAP65-1/Ase1 on MT bundles, physical collisions between growing MT bundles in the presence of these proteins resulted in the same events as observed for individual MTs (Figure S3). In particular, MT bundles induced by MAP65-1 and Ase1 co-aligned very efficiently at angles of up to 45 °, whereas those induced by MAP65-4 and Chimera 1-4 were not able to co-align at angles higher than 25° (Figure S3). Interestingly, in the presence of MAP65-1, the steep angle collisions between bundles (>45°) were sometimes associated with a local deformation of the resident bundles over a length of 5 μM (Figure S4). However, the occurrence of these events was too scarce to be reliably quantified. Conversely, such deformations were never observed in the presence of MAP65-4 or Chimera 1-4.

Discussion

Up to now, only two MAPs have been found to alter the flexibility of MTs: the neuronal MAPs tau and MAP2, which increase MT rigidity probably by strengthening lateral and/or longitudinal interactions between tubulin dimers along the MT wall (17, 35, 36). How MAP65-1 and Ase1 soften MTs remains to be explored. Previous studies have described a direct relationship between MT dynamics and mechanical properties (10). In particular, high polymerization rates and/or frequent transitions from shrink to growth have been proposed to increase MT flexibility (13, 37). Here, we exclude such an explanation since MAP65-1 does not affect growth nor shrinkage rates of individual MTs *in vitro* (unpublished observations) and this has also been suggested for MAP65-1 and Ase1 in cells (26, 38). Furthermore, the MT binding domain by itself decreases MT rigidity. Thus, we suggest that the MT Lp increase rather involves structural modifications in the MT lattice induced by the direct interaction of MAP65-1/Ase1 MT-binding domain during MT assembly. Along this line, it has been hypothesized that lattice defects decrease MT rigidity (13, 16). Up to now, we still have a very limited understanding of how MAP65-1/Ase1 bind to MTs and could potentially modify MT lattice organization, although recent cryoEM reconstructions revealed that PRC1 interacts with single dimers along protofilaments (28). High-resolution structures of MAP65-1/Ase1/MT complexes will be required to address further these questions.

Besides modifying the mechanical properties of single MTs, MAP65-1 and Ase1 also increase the flexibility of cross-linked MTs and consequently might not prevent MT sliding inside the bundle during their deformation. This suggests that either MAP65 diffuse between cross-linked MTs or MAP65 can adopt different configurations. Along this line, recent studies have shown that Ase1, if decreasing MT sliding velocities generated by motors, do not inhibit it (39). Furthermore, Kapitein et al (40) showed that

Ase1 diffuses between cross-linked MTs. The predicted L_p of bundles, that we determined using formulae given in the supplemental method (table 4), show that the L_p bundle should scale with the length of the MAP bond, which is, respectively, of 6 nM (Ase1, 21, data not shown), 15 nm (MAP65-4, 32), 20 nm (Chimera 1-4, data not shown), and 30 nm (MAP65-1, 31). However, our experimental data indicate a different picture, since we ended up with two groups of bundles according to the MAPs softening properties: bundles generated by MAP65-1 and Ase1 on one hand and bundles generated by MAP65-4 and Chimera 1-4 on the other hand. Furthermore, MAP65-1 and Ase1 that generate different MT interspacing length, induce bundles having comparable L_p values suggesting that the softening effect of Ase1 could be more pronounced than the one of MAP65-1 for bundled MTs. These results stress the complexity of the interactions between these two MAP65 and the MTs within bundles and further studies are necessary to address this question and the consequences for MT mechanics.

Our results reveal intrinsic biophysical properties of MAP65 that are likely important for a wide range of cellular processes. In particular, in plant cells where MT encounters at steep contact angles have been suggested to be sufficient to explain their proper self-organization into ordered cortical bundles (41, 42). As MAP65-1 and its homolog MAP65-2 induce MT bundling *in vivo* (26, 43), we propose that these two MAP65 by softening and bundling MTs are the key proteins involved in these processes. Although these mechanisms have been extensively observed in plant cells, we suggest that they may also apply to a wide range of differentiated eukaryote cells that create self-ordered bundle arrays. Furthermore, the MT bundle softness due to MAP65-1 might facilitate their growth between adjacent cell faces in order to create the typical cortical arrays that bound different faces of the plant cells and which is involved in regulating cell expansion. In line with our observations, recent *in vivo* studies from Dhonukshe et al. (43) have suggested that the transfacial MT bundles could be guided through MAP65-mediated CLASP localization. As well, the buckling of MTs bundled by Ase1 that has been observed in fission yeast in correlation with nucleus positioning (9) might involve a decrease in MT stiffness. Beside MT cortical deformations in interphase, the regulation of MT mechanical properties by MAP65-1/Ase1 might also have implications for organizing the mitotic midzone. Indeed, to build the core of the midzone that give the spindle structural integrity, MAP65-1/Ase1/PRC1 cross-link anti-parallel overlapping MTs that grow from the two opposite poles (19, 22, 38). An increase in their flexibility must allow them to co-align after encountering at steep angles (up to 40°), favoring the bundling of numerous

MTs and the subsequent midzone formation (29). More generally, MT buckling and bending is commonly observed in the cytoplasm of various eukaryote cells (5). However, the MT curvature that is observed at a scale of a few micrometers in cells is far to be compatible with the MT Lp measured *in vitro* (1 to 8 mm,10). In this study, by revealing that MAPs are able to significantly soften MTs *in vitro*, we suggest that this type of proteins could be at the origins of MT deformations observed in the cytoplasm of various living cells and thus are able to regulate the local mechanical properties of MTs. Beside MAPs, we are aware that other molecular mechanisms such as post-translational modifications of tubulin could affect the MT lattice and thus alter as well the MT flexural rigidity.

To conclude, MAP-induced MT flexibility may have numerous cell biological consequences, since it represents an alternative and simpler way for MT arrays to organize, compared to assembly/disassembly processes. Hence, an increase in MT flexibility should allow them to explore the cellular space laterally for binding partners, to bend and continue growing in a new direction when encountering obstacles and/or to co-align with other MTs. So, MT softening by MAPs represents a new mechanism to regulate the plasticity of MT networks in cells.

Material and Methods

Protein purification

Bovine brain tubulin was purified according to Vantard et al (44) in BRB80 buffer (80 mM PIPES, pH 6.8, 1 mM EGTA, and 1 mM MgCl₂). Fluorescent tubulin (Alexa488-labeled tubulin and Alexa568-labeled tubulin) and biotinylated tubulin were prepared according to Hyman *et al.* (45). Recombinant MAP65-1/4 and MAP65-1(3) were expressed and purified according to Gaillard *et al.* (31), and Ase1 (kindly provided by Marcel Janson) according to Janson *et al.* (25). The plasmid construct of Chimera 1-4 is a fusion of the projection domain of MAP65-1 (aa 1 – 340) and the MT-binding domain of MAP65-4 (aa 320 - 648) in the plasmid used for MAP65 (31). Chimera 1-4 was expressed and purified as described for MAP65-1/4.

Determination of the apparent Kd of MAP65

Apparent Kd of MAP65-1, MAP65-1(3), MAP65-4, Chimera 1-4

Taxol-stabilized MTs were prepared by incubating purified tubulin with equimolar concentrations of taxotere in BRB80 buffer supplemented with 1 mM GTP, for 30 min at

37°C. Various concentrations of GFP-MAP65 (in MAP buffer: 50 mM NaPi, pH 7.9, 0.1 M NaCl, 0.5 mM DTT) were mixed with 2 μ M MTs in binding buffer (1x BRB80/0.5x MAP buffer). After 30 min at room temperature, samples were centrifuged during 20 min at 100,000 g at 25°C. Supernatant was kept, and the pellet was resuspended in binding buffer supplemented with 0.5 M NaCl to detach MAP65 from MTs. The amount of GFP-MAP65 in the pellet and the supernatant was measured by spectrofluorimetry (excitation 490nm; emission 512 nm). All tubes were silanized to limit non-specific adsorption of MAP65 (46).

Apparent kD of Ase1

50 nM recombinant His-Ase1-GFP was mixed with various concentrations of taxol-stabilized MTs (from 0 to 1000 nM) in NaH₂PO₄ 25mM, NaCl 100 mM, pH7.4 and incubated for 30 min at room temperature. Samples were then centrifuged during 20 min at 100,000 g at 25°C. Supernatants were kept and pellets were resuspended in NaH₂PO₄ 25mM, NaCl 500 mM, pH7.4. The amount of His-Ase1-GFP in the pellets and supernatants was determined by spectrofluorimetry as described above.

***In vitro* microtubule encountering assays**

Perfusion chambers: Glass and coverslips were cleaned by successive chemical treatments (30 min acetone, 15 min ethanol (96.5°), washed in ultrapure water, incubated 2h in Helmanex III (2% in water, Hellma), washed in ultrapure water, and dried with filtered airflow. After exposure to air plasma (2 min at 60W), coverslips were functionalized overnight in a solution of Silane-PEG-Biotin (3.5 kDa, 1mg/ml in ethanol 96.5° + 30mM of HCl, from Susos) under gentle agitation at room temperature. Glasses were passivated overnight in a solution of Silane-PEG (30 kDa, 1mg/ml in ethanol 96.5° + 30mM HCl, from creativePEGwork) under gentle agitation at room temperature. Glasses and coverslips were successively washed in ethanol and ultrapure water, dried with filtered air, and stored at 4°C away from dust. A flow cell chamber with an approximate volume of 20 μ l was constructed with double-sided tape (70 μ m height) between the glass and the coverslip. The perfusion chamber was coated with neutravidin (25 μ g/ml in 1% BSA in BRB80; Pierce), washed with 300 μ l of 1% BSA in BRB80, and further passivated for 1 min with PLL-g-PEG (2 kDa, 0.1 mg/ml in 10 mM Hepes, pH 7.4, Jenkem).

MT seed preparation. MT seeds were obtained by polymerizing 20 μ M tubulin (80 % biotinylated tubulin and 20 % ATTO-561-labeled tubulin) in presence of 0.5 mM GMPCPP in BRB80 at 37°C for 1h. Next, 2 μ M taxotere was added and MT seeds were further incubated at room temperature for 30 min. MT seeds were then centrifuged for 5 min at 300,000 g and

resuspended in an equal volume of BRB80 supplemented with 0.5 mM GMPCPP and 2 μ M taxotere. They were stored in liquid nitrogen and quickly warmed at 37°C before use (47). Seed bundles were obtained by incubating 0.3 μ M MT seeds with either 0.1 μ M MAP65-1, MAP65-4, Ase1, or Chimera 1-4 for 10 min at room temperature.

***In vitro* encountering assays.** MT seeds were incubated for 5 min in the perfusion chamber, where they were immobilized on coverslips through the neutravidin/biotin link. They were elongated with an elongation mix containing 22 μ M tubulin (30% ATTO-561 labeled tubulin and 70 % unlabeled tubulin), 1 mM GTP, an oxygen scavenger cocktail (120 μ g/mL glucose, 8 μ g/mL catalase, and 40 μ g/mL glucose oxidase), 20 μ M DTT (Sigma), 1% BSA and 0.025 % methyl cellulose (1500 CP, from Sigma) in mix buffer (1x BRB80/0.5x MAP buffer) in the presence or the absence of MAP65. MT dynamics were visualized using an objective-based azimuthal ilas2 TIRF microscope (Nikon eclipse Ti, modified by Roper scientific) and Evolve 512 camera (Photometrics). Microscope stage was kept at 32°C using a warm stage controller (LINKAM MC60). Excitation was achieved using 491 nm and 561 nm lasers (Optical Insights). Time-lapse recording (one frame every 5 s) was performed for 30 min using Metamorph® software (version.7.7.5, Universal Imaging). Movies were processed to improve signal/noise ratio (equalize light, low pass and flatten background filters of Metamorph® software). MT bundle elongation and dynamics were analyzed using kymographs generated by Metamorph and analyzed with ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2008). The statistical significance was determined using Student's *t* test.

The contact angle was measured between two MTs or two MT bundles preceding the behavior of bundling, touch and run, or crossing. The frequency for each behavior was calculated for nine contact angle ranges of 10° from 0 to 90°.

Microtubule flexibility measurements

Micro-patterning technique and flow chamber for flexibility. The micro-patterning technique was adapted from Portran *et al.* (29). Lines 3- μ m thick were micropatterned on silane-PEG-passivated coverslips by exposure for 20 sec under deep UV (185 nm; UVO Cleaner Model 144AX-220 Jelight company) through a photomask (Toppan). Micropatterns were functionalized by neutravidin (25 μ g/ml) to allow attachment of biotinylated stabilized MT seeds as described above. A flow cell (30 μ l volume) with two perpendicular channels was constructed with double-sided tape (70 μ m height) between the glass and the patterned coverslip. The MT biotinylated seeds (2 nM) were attached perpendicularly to the micro-

patterned line by a continuous flow in the first channel (see scheme Figure 1A). The non-attached MT seeds were washed away by perfusing buffer (1x BRB80/0.5x MAP buffer, 1% BSA). They were further elongated as described above. When the polymerized MTs were about 10 μm long, the perpendicular flow was applied using a peristaltic pump sucking 60 μl of the elongation mix at the entry of the second channel with a speed flow between 30 and 60 $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ (measured by the beads speed at the TIRFm focal plane). MT growth and bending were visualized at 32°C using TIRF microscopy as described above. Excitation was achieved using 491- lasers to visualize tubulin ATTO-488, and 561-lasers to visualize Alexa-561 labeled beads and MT seeds. Time-lapse microscopy (one frame every 315 ms) was performed for 90 sec using Metamorph® software (version.7.7.5, Universal Imaging).

Image acquisition and velocity measurement method. To extract MT position during bending experiments, we used the plugin *JFilament* of ImageJ. To measure the fluid velocity we used the plugin *MTrackJ* of ImageJ. We collected the position of the beads and proceeded to the next image by connecting points associated with the same bead. We only took into account beads that were as bright as the seeds, assuming that these beads were in the same z position as MTs. Therefore the bead velocity was the same as the velocity of the fluid experienced by the MTs. We calculated the average velocity of the flow for each frame. If beads could not be seen for a few frames (~ 1 to 10), we interpolated the velocity between frames.

Measurement of single MTs/MT bundles rigidity. See the supplementary method and Figure S5 for a detailed description.

Acknowledgments

We thank Marcel Janson for gift of Ase1 cDNA, Manuel Théry and Laurent Blanchoin for critical reading of the manuscript. We thank François Nedelec for constructive remarks. We thank the financial support of the Institute of Complex Systems (IXXI) to M.Z.

References

1. Mitchison T, Kirschner M (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*. 312:237-42.
2. Bartolini F, Gundersen GG (2006) Generation of noncentrosomal microtubule arrays. *J Cell Sci*. 119:4155-63.
3. Dixit R, Cyr R (2004) Encounters between dynamic cortical microtubules promote ordering of the cortical array through angle-dependent modifications of microtubule behavior. *Plant Cell*. 16:3274-84.
4. Rusan NM, Wadsworth P. (2005) Centrosome fragments and microtubules are

- transported asymmetrically away from division plane in anaphase. *J Cell Biol.* 168:21-8.
5. Brangwynne CP, MacKintosh FC, Kumar S, Geisse NA, Talbot J, Mahadevan L, Parker KK, Ingber DE, Weitz DA (2006) Microtubules can bear enhanced compressive loads in living cells because of lateral reinforcement. *J Cell Biol.* 173:733-41.
 6. Bicek AD, Tüzel E, Kroll DM, Odde D (2007) Analysis of microtubule curvature. *Methods Cell Biol.* 83: 237-68.
 7. Shaw SL, Kamyar R, Ehrhardt DW (2003) Sustained microtubule treadmilling in Arabidopsis cortical arrays. *Science.* 300:1715-8.
 8. Wasteneys GO, Ambrose JC (2009) Spatial organization of plant cortical microtubules: close encounters of the 2D kind. *Trends Cell Biol.* 19:62-71.
 9. Tran PT, Marsh L, Doye V, Inoué S, Chang F (2001) A mechanism for nuclear positioning in fission yeast based on microtubule pushing. *J Cell Biol.* 16:397-411.
 10. Hawkins T, Mirigian M, Selcuk Yasar M, Ross JL (2010) Mechanics of microtubules. *J Biomech.* 43(1):23-30.
 11. Gardel ML., Kasza KE., Brangwynne CVP., Liu J., Weitz DA (2008) Mechanical response of cytoskeletal networks. *Methods Cell Biol.* 89: 487-519.
 12. Bicek AD, Tüzel E, Demtchouk A, Uppalapati M, Hancock WO, Kroll DM, Odde DJ (2009) Anterograde microtubule transport drives microtubule bending in LLC-PK1 epithelial cells. *Mol Biol Cell.* 20:2943-53.
 13. Janson ME, Dogterom M (2004) A bending mode analysis for growing microtubules: evidence for a velocity-dependent rigidity. *Biophys J.* 87:2723-36.
 14. Mickey B, Howard J (1995) Rigidity of microtubules is increased by stabilizing agents. *J Cell Biol.* 130:909-17.
 15. Pampaloni F, Lattanzi G, Jonás A, Surrey T, Frey E, Florin EL (2006) Thermal fluctuations of grafted microtubules provide evidence of a length-dependent persistence length. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:10248-53.
 16. Gittes F, Mickey B, Nettleton J, Howard J (1993) Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J Cell Biol.* 120:923-34.
 17. Felgner H, Frank R, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E, Ludin B, Matus A, Schliwa M (1997) Domains of neuronal microtubule-associated proteins and flexural rigidity of microtubules. *J Cell Biol.* 138:1067-75.
 18. Bratman SV, Chang F (2008) Mechanisms for maintaining microtubule bundles. *Trends Cell Biol.* 18:580-6.
 19. Smertenko AP, Chang HY, Wagner V, Kaloriti D, Fenyk S, Sonobe S, Lloyd C, Hauser MT, Hussey PJ (2004) The Arabidopsis microtubule-associated protein AtMAP65-1: molecular analysis of its microtubule bundling activity. *Plant Cell.* 16:2035-47.
 20. Wicker-Planquart C, Stoppin-Mellet V, Blanchoin L, Vantard M (2004) Interactions of tobacco microtubule-associated protein MAP65-1b with microtubules. *Plant J.* 39:126-34.
 21. Schuyler SC, Liu JY, Pellman D (2003) The molecular function of Ase1p: evidence for a MAP-dependent midzone-specific spindle matrix. Microtubule-associated proteins. *J Cell Biol.* 160:517-28.
 22. Mollinari C, Kleman JP, Jiang W, Schoehn G, Hunter T, Margolis RL (2002) PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone. *J Cell Biol.* 157:1175-86.
 23. Hussey PJ, Hawkins TJ, Igarashi H, Kaloriti D, Smertenko A (2002) The plant cytoskeleton: recent advances in the study of the plant microtubule-associated

- proteins MAP-65, MAP-190 and the *Xenopus* MAP215-like protein, MOR1. *Plant Mol Biol.* 50:915-24.
24. Van Damme D, Van Poucke K, Boutant E, Ritzenthaler C, Inzé D, Geelen D (2004) In vivo dynamics and differential microtubule-binding activities of MAP65 proteins. *Plant Physiol.* 136:3956-67.
 25. Janson ME, Loughlin R, Loïodice I, Fu C, Brunner D, Nédélec FJ, Tran PT (2007) Crosslinkers and motors organize dynamic microtubules to form stable bipolar arrays in fission yeast. *Cell.* 128(2):357-68.
 26. Lucas JR, Courtney S, Hassfurder M, Dhingra S, Bryant A, Shaw SL (2011) Microtubule-associated proteins MAP65-1 and MAP65-2 positively regulate axial cell growth in etiolated *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant Cell.* 23:1889-903.
 27. Bieling P, Telley IA, Surrey T (2010) A minimal midzone protein module controls formation and length of antiparallel microtubule overlaps. *Cell* 142:420-32.
 28. Subramanian R, Wilson-Kubalek EM, Arthur CP, Bick MJ, Campbell EA, Darst SA, Milligan RA, Kapoor TM (2010) Insights into antiparallel microtubule crosslinking by PRC1, a conserved nonmotor microtubule binding protein. *Cell* 142:433-43.
 29. Portran D, Gaillard J, Vantard M, They M. (2012) Quantification of MAP activity on geometrically controlled MT network. *Cytoskeleton*, in press.
 30. Berro J, Michelot A, Blanchoin L, Kovar DR, Martiel JL (2007) Attachment conditions control actin filament buckling and the production of forces. *Biophys J.* 92:2546-58.
 31. Gaillard J, Neumann E, Van Damme D, Stoppin-Mellet V, Ebel C, Barbier E, Geelen D, Vantard M (2008) Two microtubule-associated proteins of *Arabidopsis* MAP65s promote antiparallel microtubule bundling. *Mol Biol Cell.* 19:4534-44.
 32. Fache V, Gaillard J, Van Damme D, Geelen D, Neumann E, Stoppin-Mellet V, Vantard M (2010). *Arabidopsis* kinetochore fiber-associated MAP65-4 cross-links microtubules and promotes microtubule bundle elongation. *Plant Cell.* 22:3804-15.
 33. Tulin A, McClerklin S, Huang Y, Dixit R (2012) Single-molecule analysis of the microtubule cross-linking protein MAP65-1 reveals a molecular mechanism for contact-angle-dependent microtubule bundling. *Biophys J.* 102:802-9.
 34. Dixit R, Cyr R (2004) Encounters between dynamic cortical microtubules promote ordering of the cortical array through angle-dependent modifications of microtubule behavior. *Plant Cell.* 16(12):3274-84.
 35. Kar S, Fan J, Smith MJ, Goedert M, Amos LA (2003) Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol. *EMBO J.* 22:70-7.
 36. Santarella RA, Skiniotis G, Goldie KN, Tittmann P, Gross H, Mandelkow EM, Mandelkow E, Hoenger A (2004). Surface-decoration of microtubules by human tau. *J Mol Biol.* 339:539-53.
 37. VanBuren V, Cassimeris L, Odde DJ (2005) Mechanochemical model of microtubule structure and self-assembly kinetics. *Biophys J.* 89:2911-26.
 38. Loïodice I, Staub J, Setty TG, Nguyen NP, Paoletti A, Tran PT (2005) Ase1p organizes antiparallel microtubule arrays during interphase and mitosis in fission yeast. *Mol Biol Cell.* 16:1756-68.
 39. Braun M, Lansky Z, Fink G, Ruhnow F, Diez S, Janson ME (2011) Adaptive braking by Ase1 prevents overlapping microtubules from sliding completely apart. *Nat Cell Biol.* 13:1259-64.
 40. Kapitein LC, Janson ME, van den Wildenberg SM, Hoogenraad CC, Schmidt CF, Peterman EJ (2008) Microtubule-driven multimerization recruits ase1p onto overlapping microtubules. *Curr Biol.* 18:1713-7.

41. Eren EC, Dixit R, Gautam N (2010) A three-dimensional computer simulation model reveals the mechanisms for self-organization of plant cortical microtubules into oblique arrays. *Mol Biol Cell*. 21:2674-84.
42. Allard JF, Ambrose JC, Wasteneys GO, Cytrynbaum EN (2010) A mechanochemical model explains interactions between cortical microtubules in plants. *Biophys J*. 99(4):1082-90.
43. Dhonukshe P, Weits DA, Cruz-Ramirez A, Deinum EE, Tindemans SH, Kakar K, Prasad K, Mähönen AP, Ambrose C, Sasabe M, Wachsmann G, Luijten M, Bennett T, Machida Y, Heidstra R, Wasteneys G, Mulder BM, Scheres B (2012) A PLETHORA-auxin transcription module controls cell division plane rotation through MAP65 and CLASP. *Cell* 149 :2071-93.
44. Vantard M, Peter C, Fellous A, Schellenbaum P, Lambert AM (1994) Characterization of a 100-kDa heat-stable microtubule-associated protein from higher plants. *Eur J Biochem*. 220:847-53.
45. Hyman A, Drechsel D, Kellogg D, Salser S, Sawin K, Steffen P, Wordeman L, Mitchison T (1991) Preparation of modified tubulins. *Methods Enzymol*. 196:478-85.
46. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor laboratory press.
47. Gell C, Bormuth V, Brouhard GJ, Cohen DN, Diez S, Friel CT, Helenius J, Nitzsche B, Petzold H, Ribbe J, Schäffer E, Stear JH, Trushko A, Varga V, Widlund PO, Zanic M,

Legends of figures

Figure 1. MAP65-1/Ase1 decrease flexural rigidity of individual MTs

(A). Measurement of MT persistence length. **a.** Scheme of the experimental setup. MT seeds are introduced in a flow-through chamber composed of a micro-pattern slide (bar shape) saturated with neutravidin and a glass support. They are aligned on functionalized bar patterns by the flow and attached on the micro-pattern surface via biotin neutravidin link (step 1). MT seeds are further elongated by the addition of Alexa-labeled tubulin in the presence or the absence of MAP65 and in the presence of fluorescent beads (step 2). When MTs reach a length of 10 μm on average, the elongation mix is perfused into the flow chamber perpendicularly to the elongating MTs in order to bend them (step 3). When the flow speed reaches its maximum and when it is stabilized, MT bending is measured (step 4). **b.** Time series of bending MTs that elongate in presence or absence of 100 nM MAP65-1/Ase1. MTs are in green (ATTO 488-labeled tubulin, 22 μM), MT seeds (ATTO 561-labeled tubulin) as well as beads (Alexa 561) are in red. MT bending is acquired with a frame rate of 315 ms. **c.** Superposition of the images in (b) showing the amplitude of the MT bending (red arrows).

(B). Histograms of the ratio between the L_p of single MTs grown in the absence of MAPs and the L_p of MTs grown in the presence of 100 nM MAP65-1 or Ase1. MAP65-1 and Ase1 significantly decrease MT L_p .

(C). Plot of the MT L_p in presence of different concentrations

of MAP65-1 (from 1 to 100 nM).

Figure 2. The MT-binding domain of MAP65-1 increases MT flexibility.

(A). Scheme of MAP65-1, MAP65-1(MBD), MAP65-4, and Chimera 1-4 constructs. MAP65-1 and MAP65-4 are divided into two domains: the projection and the MT-binding domain. The most conserved motif is underlined. Chimera 1-4 was obtained by replacing the projection domain of MAP65-4 with the projection domain of MAP65-1. (B). a. Time series of bending MTs that elongate in presence of 100 nM MAP65-4/Chimera 1-4/MAP65-1(MBD) and 22 μ M of ATTO 488-labeled tubulin. MT bending is acquired with a frame rate of 315 ms. b. Superposition of the images in (a) showing the amplitude of the bending (red arrows). (C) Histogram of the ratio between the L_p of single MTs grown in the absence of MAPs and the L_p of MTs grown in the presence of 100 nM MAP65-4, Chimera 1-4, and the MT-binding domain of MAP65-1.

Figure 3. MT bundle flexibility is differently regulated depending on MAP65 cross-linker.

(A). Scheme of the experimental setup (top panel). MT seed bundles are immobilized on functionalized bar shape patterns via biotin neutravidin link (step 1), and further elongated by perfusing tubulin in presence of MAP65 and fluorescent beads as described in Figure 2 (step 2). The hydrodynamic flow is applied when growing bundles have an average length between 10 to 20 μ m (middle pattern) (step 3). Time series of a bending bundle that elongates in presence of 22 μ M ATTO 488-labeled tubulin, 100 nM MAP65-4, and fluorescent beads (left-bottom panel). Linescan of the MT bundle (right-bottom panel). MT number in the bundle is determined by the level of fluorescence (right panel). (B). a. Time series of bending bundles that elongates in presence of 22 μ M ATTO 488-labeled tubulin and 100 nM MAP65-1. b. Superposition of the images showing the amplitude of the bending (red arrows).

Figure 4. MT encountering events between single or bundled MTs

(A). (a) Scheme of the experimental set up. MT seeds are introduced in a flow chamber coated with silane-PEG-biotin on the glass coverslip and silane-PEG on the glass. MT seeds are attached by biotin-neutravidin link to the glass coverslip. They are further elongated by the addition of Alexa-561-labeled tubulin in the presence or the absence of MAP65. (b) Angles as they are defined in the manuscript. (B). Time-lapses of single elongating MTs in the presence of GFP-MAP65-1 (50 nM) and ATTO-568 labeled tubulin (22 μ M) that bundle

after collision (observed by TIRF microscopy). Arrowheads indicate the growing ends of collide MTs that encounter resident MTs. **(C-D)**. Histograms represent the frequencies of bundling events between two individual MTs (C) or two bundles (D) as a function of their angle of interaction and of MT polarity in presence of 50 nM MAP65-1, Ase1, MAP65-4 and Chimera 1-4 (with range of ten degrees, from 0° to 90°). Encountering frequencies are the ratio of co-aligned MTs over the total number of encountering events. Black and hatched bars correspond respectively to antiparallel and parallel interactions between MTs.

| Conditions | Number of MTs | MT length (μm) | Lp (mm) | Lp control/Lp MAPs |
|---------------|---------------|-----------------------------|-----------------|--------------------|
| Control | 9 | 10.39 \pm 0.65 | 1.58 \pm 0.62 | 1 |
| Ase1 | 5 | 10.5 \pm 0.8 | 0.45 \pm 0.18 | 3.22 |
| MAP65-1 | 13 | 11.62 \pm 1.17 | 0.39 \pm 0.16 | 4.05 |
| MAP65-1 (MBD) | 4 | 8.3 \pm 0.63 | 0.81 \pm 0.34 | 1.79 |
| MAP65-4 | 4 | 13.81 \pm 2.17 | 1.39 \pm 0.47 | 1.04 |
| Chimera 1-4 | 6 | 13.0 \pm 2.42 | 1.29 \pm 0.65 | 1.12 |

Table 1. MT persistence length in presence of MAP65

Effective number, average length, and calculated Lp for single growing MTs in the absence or the presence of 100 nM MAP65.

| Conditions | Number of bundles | Bundle length (μm) | Lp (mm) of bundles of 2 MTs | Number of bundles | Bundle length (μm) | Lp (mm) of bundle of 3 MTs |
|-------------|-------------------|---------------------------------|-----------------------------|-------------------|---------------------------------|----------------------------|
| MAP65-4 | 6 | 16 \pm 3.97 | 3.49 \pm 0.98 | 3 | 14.35 \pm 1.06 | 4.16 \pm 1.24 |
| Chimera 1-4 | 9 | 15.75 \pm 2.93 | 2.58 \pm 1.07 | 7 | 15.59 \pm 3.68 | 4.07 \pm 1.15 |
| MAP65-1 | 2 | 16.16 \pm 3.95 | 1.31 \pm 0.57 | 7 | 14.91 \pm 1.3 | 1.30 \pm 0.80 |
| Ase1 | 13 | 14.94 \pm 4.31 | 1.05 \pm 0.44 | 6 | 16.59 \pm 3.8 | 1.16 \pm 0.66 |

Table 2. MT bundle persistence length in presence of MAP65

Effective number, average length, and calculated Lp for growing MT bundles in the presence of 100 nM MAP65. Bundles are composed of 2 or 3 MTs.

Figure 1

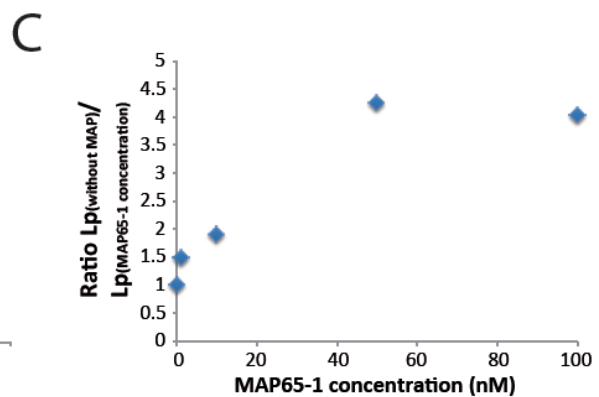
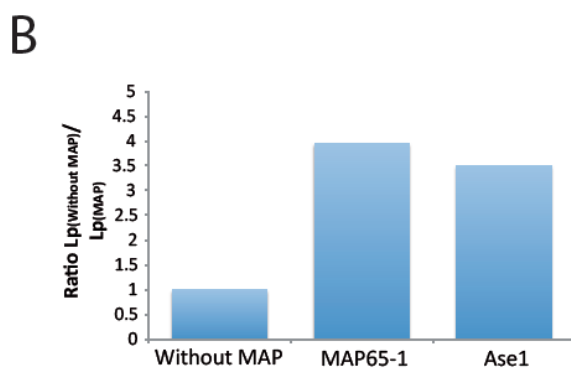
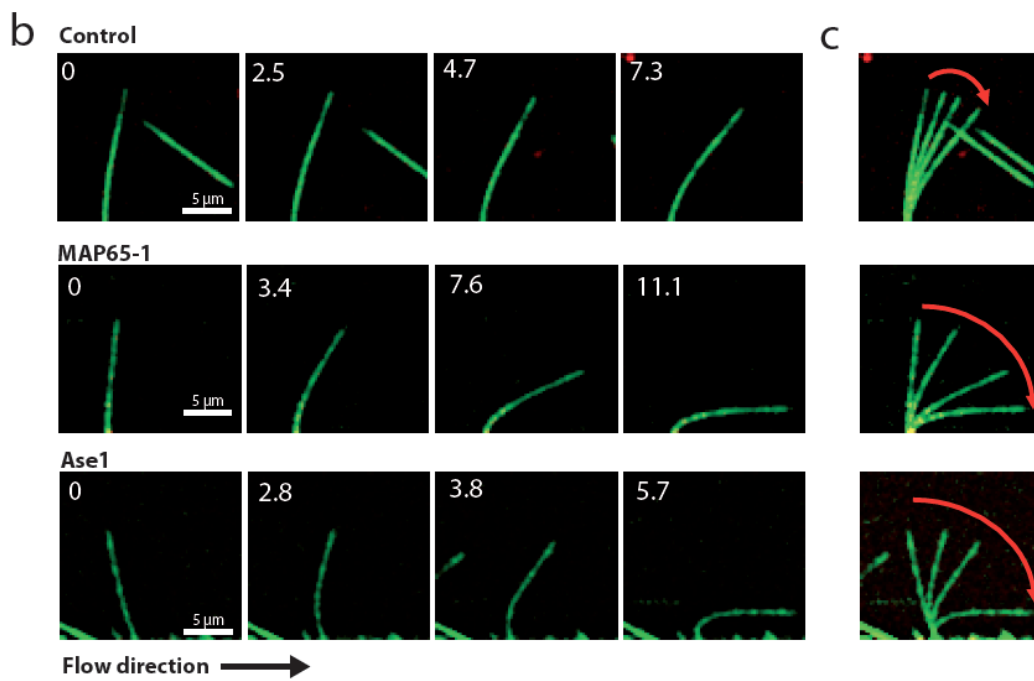
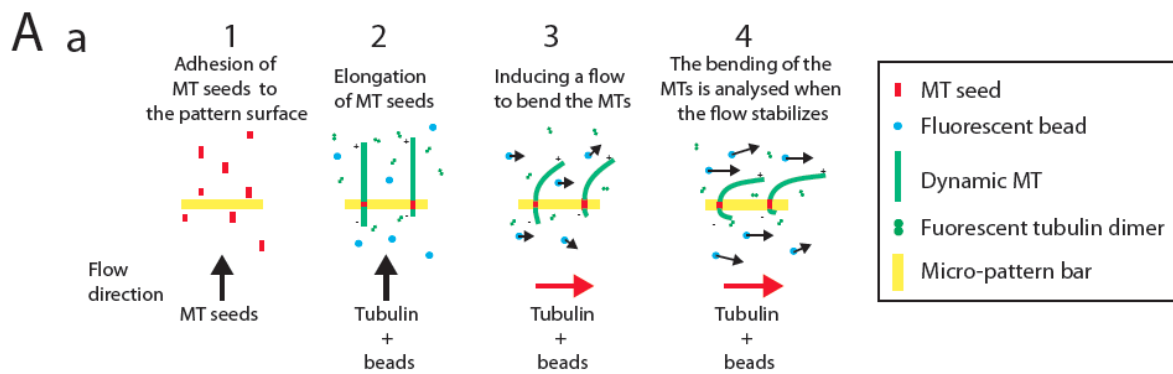


Figure 2

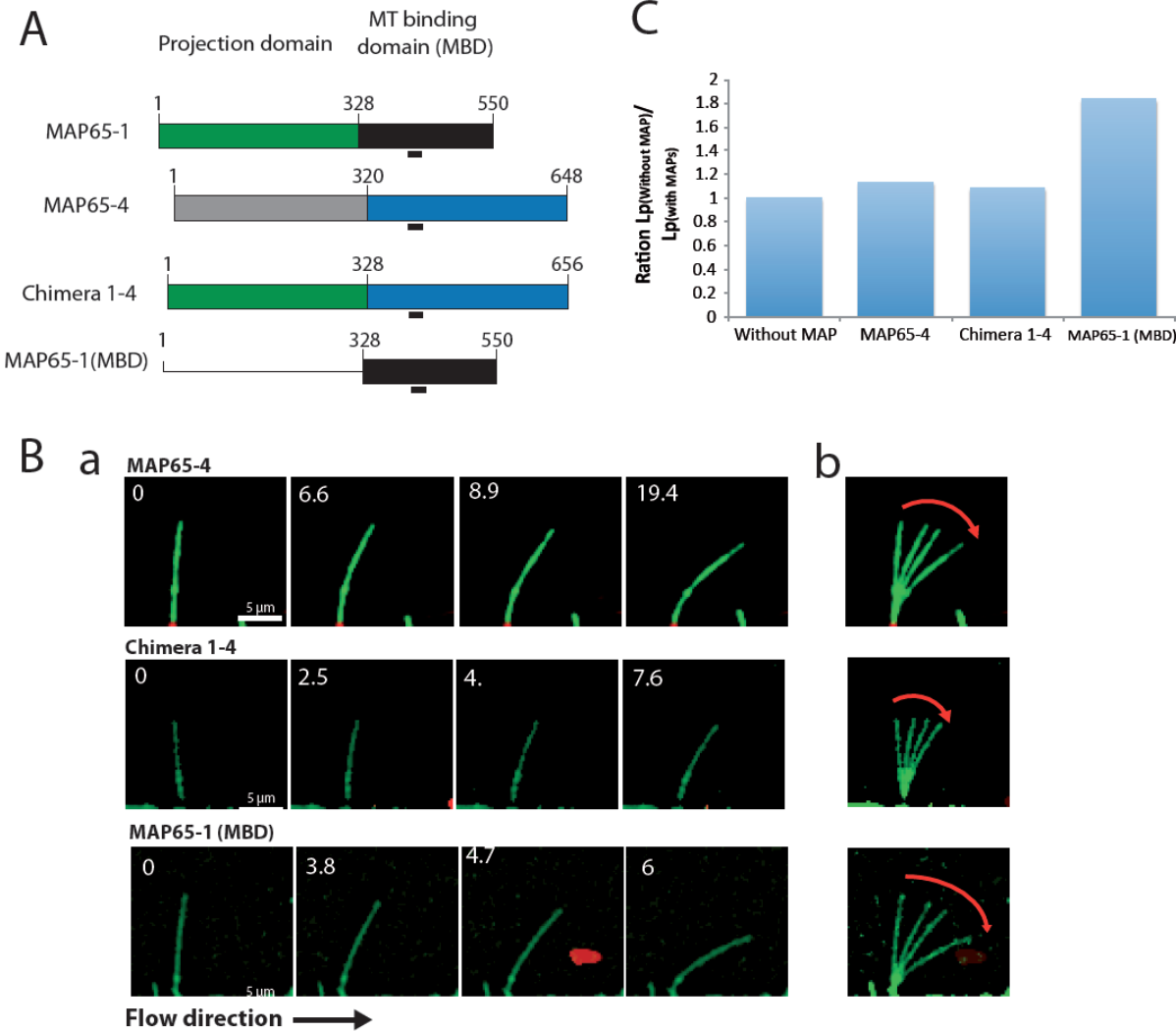


Figure 3

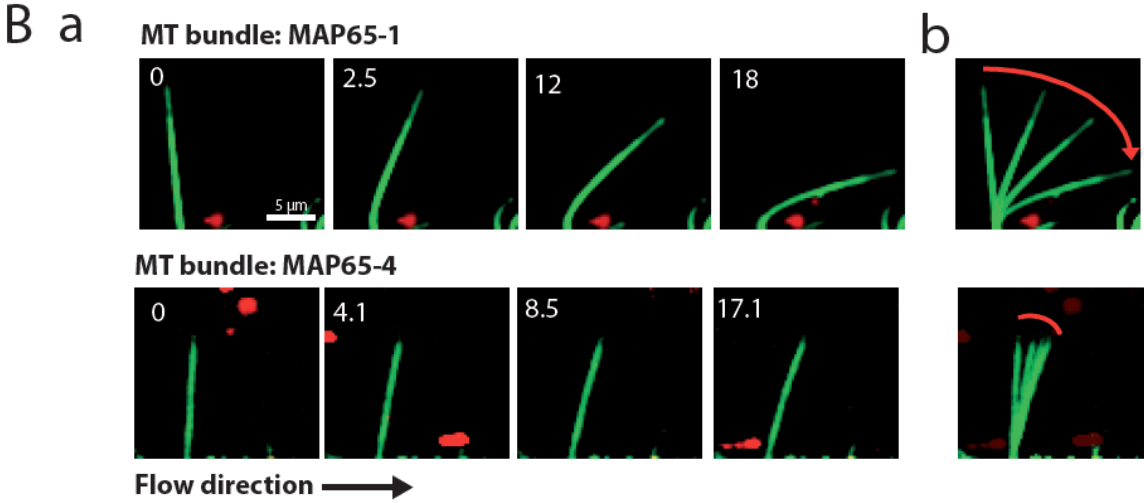
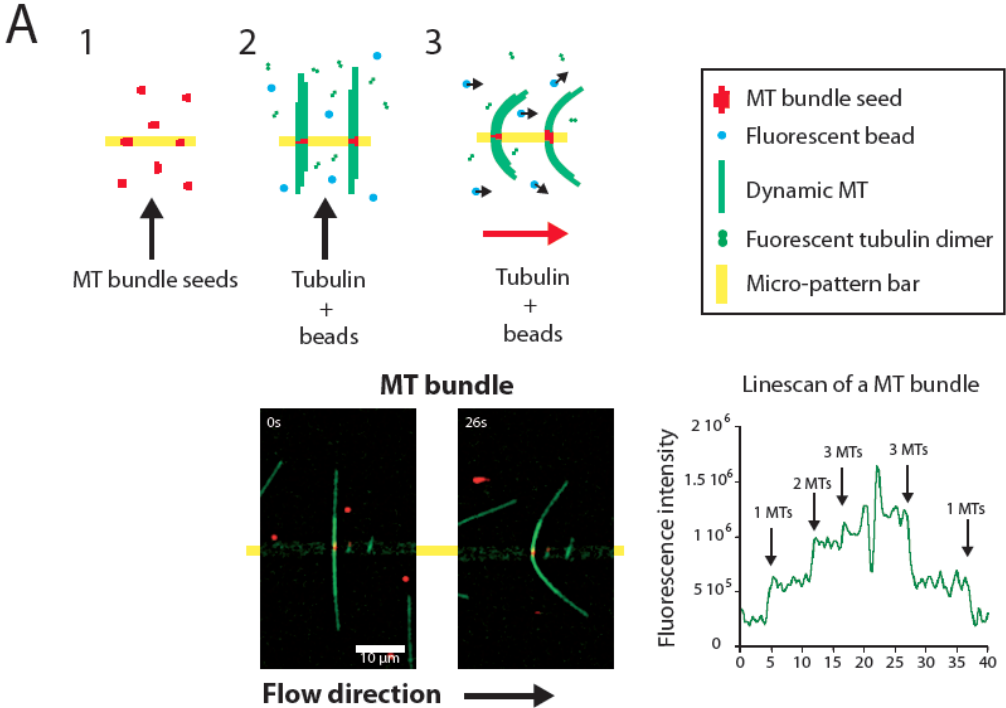
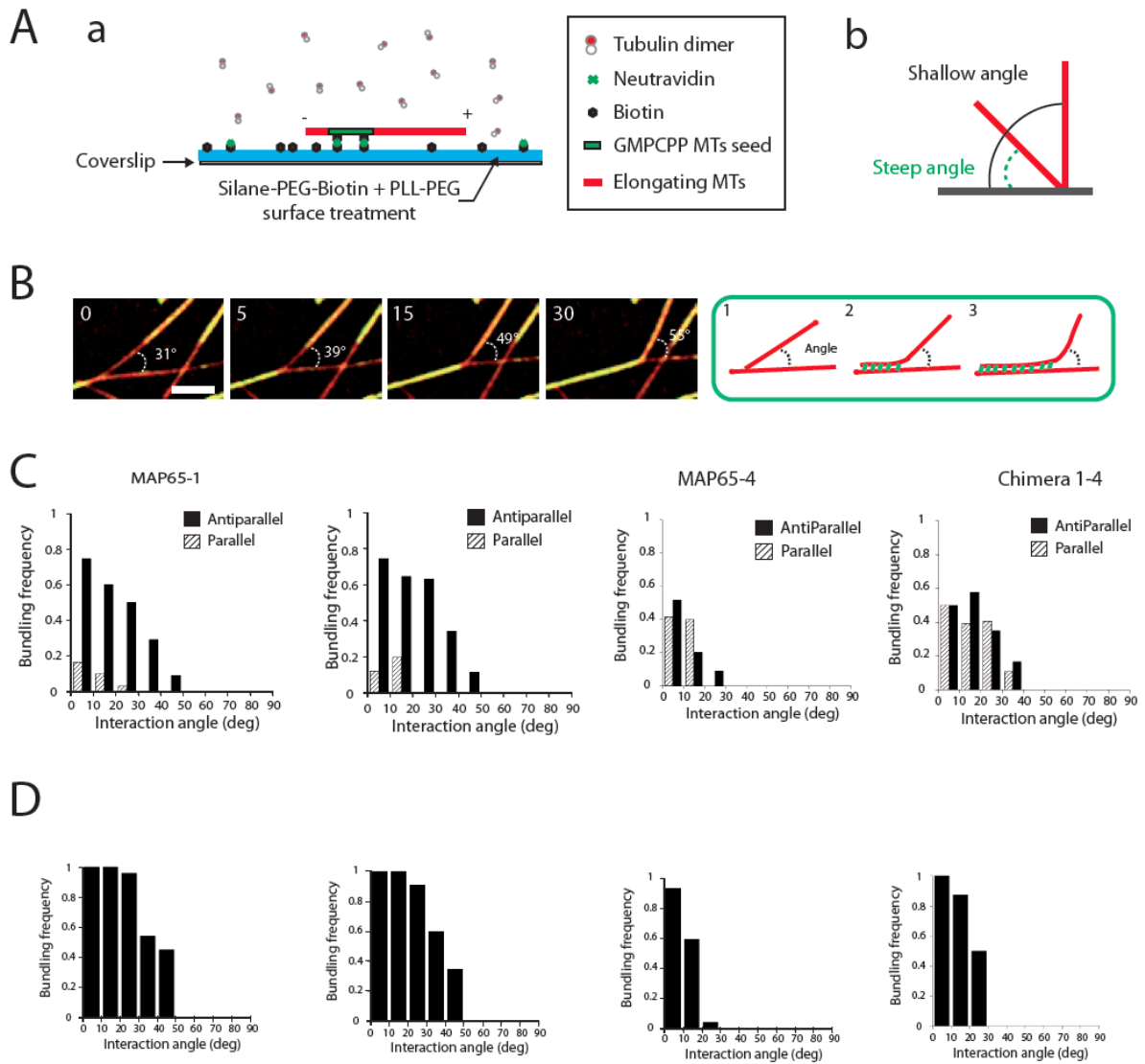


Figure 4



MAP65/Ase1 increase microtubule flexibility

D. Portran¹, M. Zoccoler¹, J. Gaillard¹, V. Stoppin-Mellet¹, E. Neumann², I Arnal³, J.L. Martiel¹, M. Vantard^{1*}

¹Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant (iRTSV), Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale UMR CNRS, CEA, INRA, Université Joseph Fourier, 38054 Grenoble, France

²Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, CNRS, CEA, Université Joseph Fourier, Grenoble 38027, France

³Institut de Neurosciences, INSERM, Université Joseph Fourier, La Tronche 38706, France

This file contains supporting legends of supplementary figures and movies.

Figure S1. Protein purification and measurement of MAP65 apparent Kd

(A-E). For each MAP65, the Coomassie-stained SDS-PAGE gel of the purified recombinant His-MAP65 and His-MAP65-GFP is shown on the left, and the data corresponding to the measurements of the apparent kDa are shown on the right. For MAP65-1, MAP65-4, Chimera 1-4, and MAP65-1(MBD), the data were graphed as the concentration of His-MAP65-GFP bound to MTs in function of the unbound His-MAP65-1-GFP concentration. For Ase1, the data were graphed as the concentration of His-Ase1-GFP in function of total tubulin concentration. (F). Table summarizing the different apparent Kd determined for the various MAP65 and constructs used in this study.

Figure S2. Predicted Lp for different bundle configurations and orientations.

Schematic representation of different bundles formed by two or three MTs that are bent in a flow. Only two orientations of bundles relative to the fluid flow are sketched. The number in bracket gives the bundle configuration and the Lp is expressed as a multiplicative factor of single MT Lp. The predicted Lp is based on the assumption that both the angle of the bond along the MT lattice and the bond length are constant during bundle deformation. The angle and the bond length are, respectively, 60° and 30 nm for MAP65-1 (31) and 90° and 15 nm for MAP65-4 (32). For Ase1, only the length bond (6 nm) is determined (21, data not shown).

Figure S3. Encountering event distribution of individual MTs in presence of MAP65

(A). Time-lapses of single MTs elongating from MT seeds in the presence of GFP-MAP65-1 (50 nM) and ATTO-568 labeled tubulin (22 μM), observed by TIRF microscopy (left). The three MT outcomes observed are represented: bundling (top panel), cross-over (middle

panel), and touch-and-run (bottom panel). Arrowheads indicate the growing ends of collide MTs that encounter resident MTs. Schemes on the right panel illustrate the different MT outcomes observed in the assay. MTs are in red with their minus ends marked by a black disc and their dynamic ends by black arrows. **(B)**. Histograms represent the frequencies of crossing (B) and (C) touch and run events between two individual MTs as a function of their angle of interaction and of MT polarity in presence of 50 nM MAP65-1, Ase1, MAP65-4 and Chimera 1-4 (with range of ten degrees, from 0° to 90°). Black and hatched bars correspond respectively to antiparallel and parallel interactions between MTs. Encountering frequencies are the ratio of co-aligned MTs over the total number of encountering events. **(D)**. Table of the frequencies of the three outcomes observed between MTs that are classified according to the MT encounter angle and the MT polarity.

Figure S4. Encountering event distribution of MT bundles induced by MAP65

(A-B). Histograms of encountering frequencies after crossing (A) and (B) touch and run events between MT bundles as a function of the interaction angles of MT bundles (with range of ten degrees, from 0° to 90°). **(C)**. Table of the frequencies of the three outcomes observed between MT bundles that are classified according to the bundle encounter angle.

Figure S5. Variables and parameters used in the model.

(A-B). Schematic representation of a MT (or bundle of MT) in the resting configuration (dotted red line) or bent by the flow (solid red line). The position of any point along the filament is determined either by its arc-length, s , or by its Cartesian coordinates ($x(s)$, $y(s)$). In addition, we define $\theta(s)$ the angle between the horizontal axis and the unit vector tangent to the filament (blue arrow, panel A). The flow velocity (red arrow, panel B) exerts a force, denoted by F (magenta arrow, panel B) all over along the filament. Since filament is at rest in the moving fluid, the elastic force developed in the filament, denoted by N (black arrow), balances the force exerted by the fluid.

The boundary conditions used in the model are indicated at both filament ends (panel A). Fixing the MT to the pattern imposes the position and the orientation of the MT at one end (panel A). At the other MT end, which is not bound to the pattern, the elastic force and bending should vanish (panel A).

Movies

Movie S1: Lp determination of single MTs (green, ATTO 488-labeled tubulin) growing from a MT seed (in red), aligned on a functionalized bar pattern. The MT is bent as described in Figure 2. Time is in minutes and seconds. Bar: 10 μm .

Movie S2: Lp determination of individual MTs (ATTO 488-labeled tubulin) growing in presence of 100 nM MAP65-1. The MT is bent as described in Figure 2. Time is in minutes and seconds. Bar: 10 μm .

Movie S3: Lp determination of a MT bundle growing in presence of 100 nM MAP65-1. MT bundles are bent as described in Figure 4. Time is in minutes and seconds. Bar: 10 μm .

Movie S4: Lp determination of a MT bundle growing in presence of 100 nM MAP65-4. MT bundles are bent as described in Figure 4. Time is in minutes and seconds. Bar: 10 μm .

Movie S5: Encountering events of individual MTs (ATTO 561-labeled tubulin) in the absence of MAPs (left movie), or in the presence of 50 nM GFP-MAP65-1 (middle movie) and GFP-Ase1 (right movie). Time is in minutes and seconds. Bar: 10 μm .

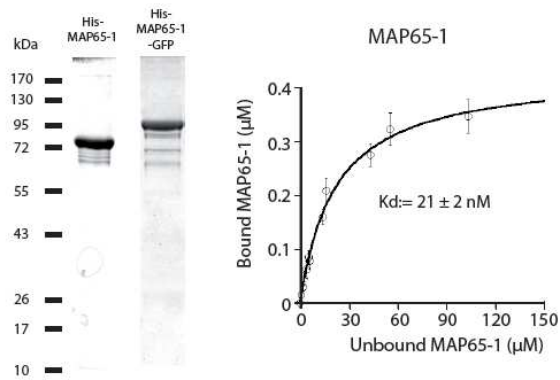
Movie S6. Example of a cross-over event between two elongating individual MTs (ATTO 561-labeled tubulin) in presence of 50 nM GFP-MAP65-1 (0.5 fps). Arrows indicate the MT end that collides with a MT. Time is in minutes and seconds. Bars: 5 μm .

Movie S7: Example of a touch and run event between two elongating individual MTs (ATTO 561-labeled tubulin) in presence of 50 nM GFP-MAP65-1. Arrows indicate the MT end that collides with a MT. Time is in minutes and seconds. Bar: 5 μm .

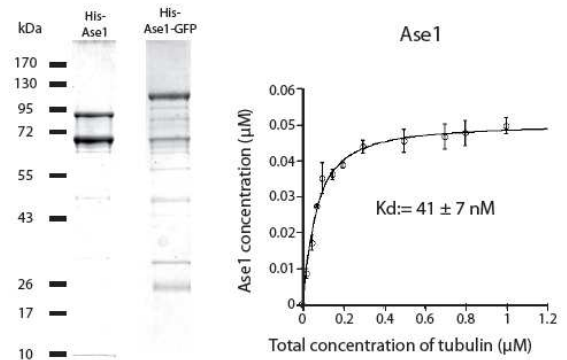
Movie S8: Example of a zippering event between two elongating individual MTs (ATTO 561-labeled tubulin) in presence of 50 nM GFP-MAP65-1. Arrows indicate the MT end that collides with a MT. Time is in minutes and seconds. Bar: 5 μm .

Figure S1

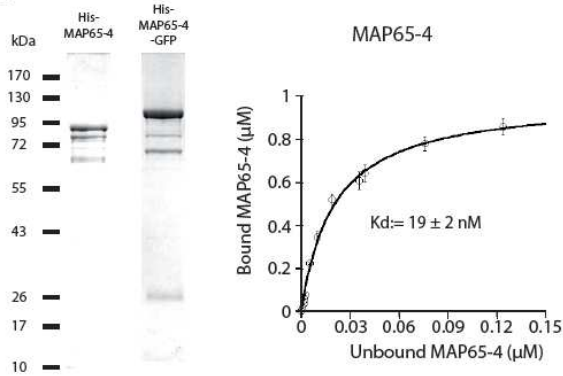
A



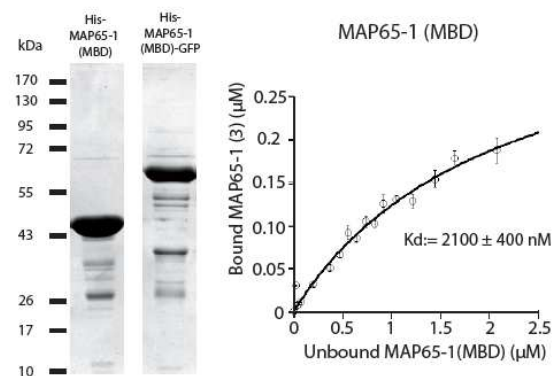
B



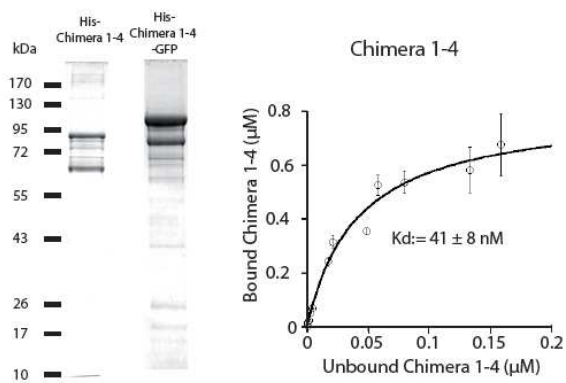
C



D



E

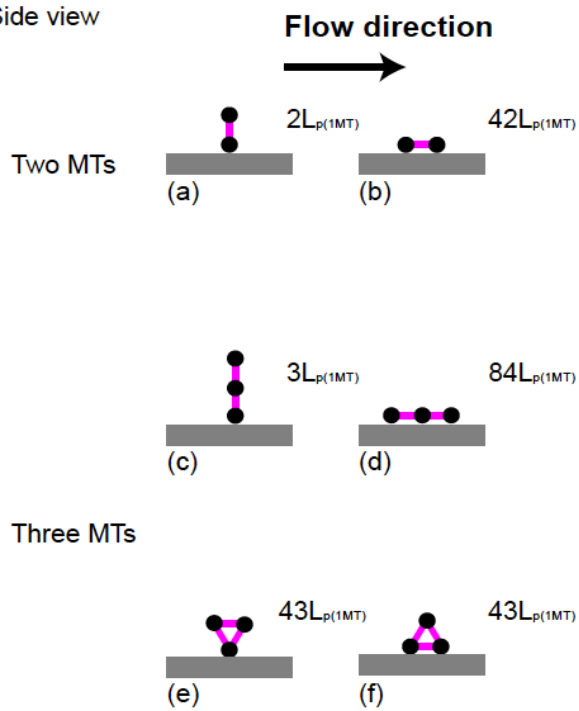


F

| | Kd (nM) | SD (nM) |
|--------------|---------|---------|
| MAP65-1 | 21 | 2 |
| MAP65-1(MBD) | 2100 | 400 |
| Ase1 | 41 | 7 |
| MAP65-4 | 19 | 2 |
| Chimera 1-4 | 41 | 8 |

Figure S2

Side view



Top view

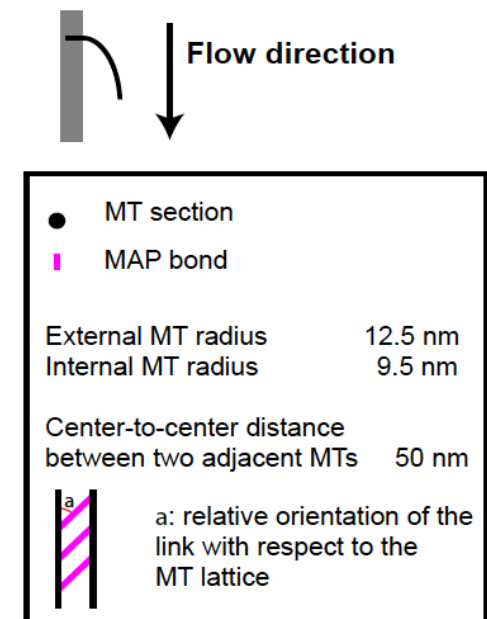
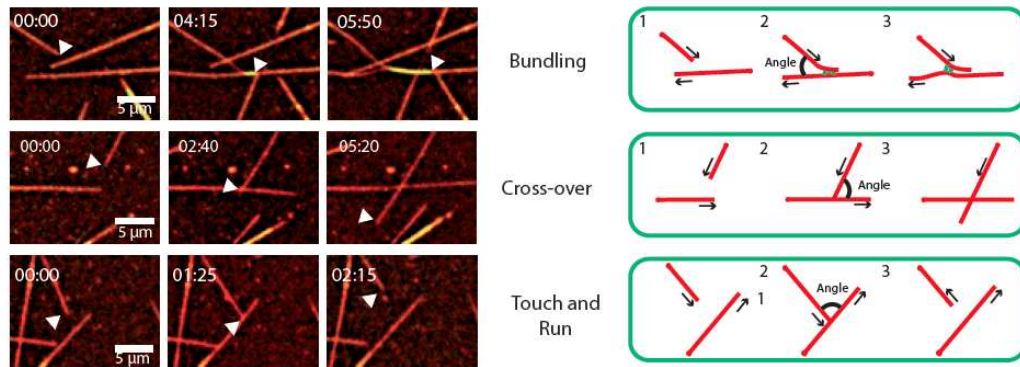
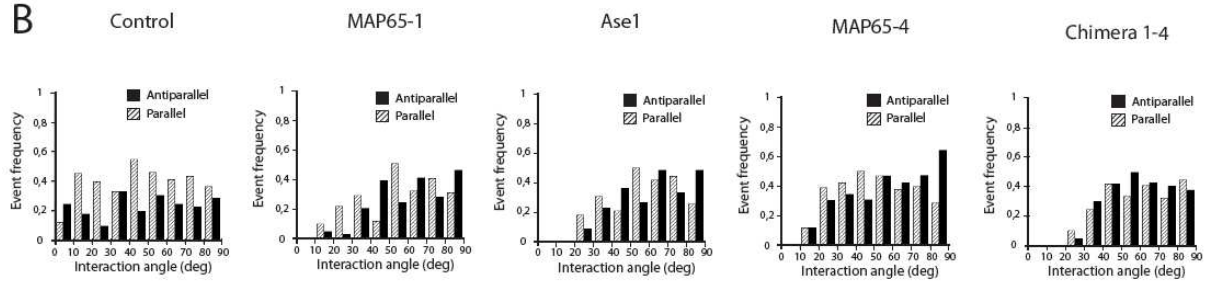


Figure S3

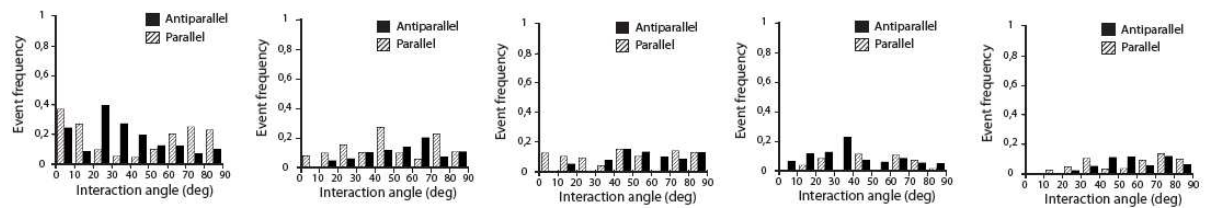
A



B



C

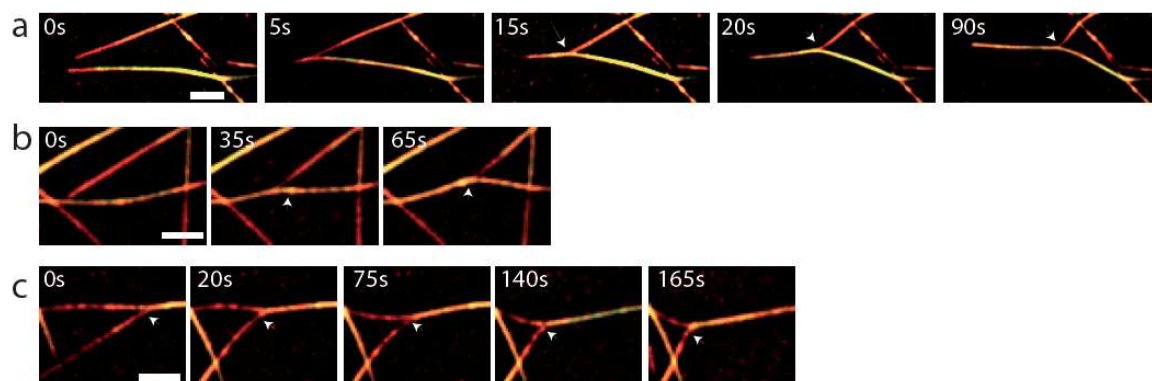


D

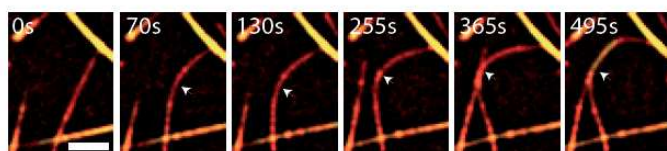
| | Type of encountering events | Number | Bundling Max angle | Bundling frequency | Cross-over frequency | Touch and Run frequency |
|-------------|-----------------------------|--------|--------------------|--------------------|----------------------|-------------------------|
| Control | Polar | 122 | 0 | 0.0% | 39.4% | 18.4% |
| | Anti-polar | 84 | 0 | 0.0% | 23.8% | 18.4% |
| MAP65-1 | Polar | 141 | 27 | 3.3% | 25.4% | 13.6% |
| | Anti-polar | 171 | 45 | 24.8% | 23.2% | 9.7% |
| Ase1 | Polar | 99 | 16 | 3.6% | 25.8% | 9.7% |
| | Anti-polar | 138 | 45 | 27.8% | 25.0% | 8.0% |
| MAP65-4 | Polar | 143 | 18 | 9.0% | 32.9% | 5.0% |
| | Anti-polar | 172 | 22 | 8.9% | 34.3% | 9.9% |
| Chimera 1-4 | Polar | 176 | 36 | 15.7% | 25.6% | 6.9% |
| | Anti-polar | 188 | 39 | 17.7% | 27.8% | 6.3% |

Figure S4

A MT zippering



B MT buckling



C MT deformation

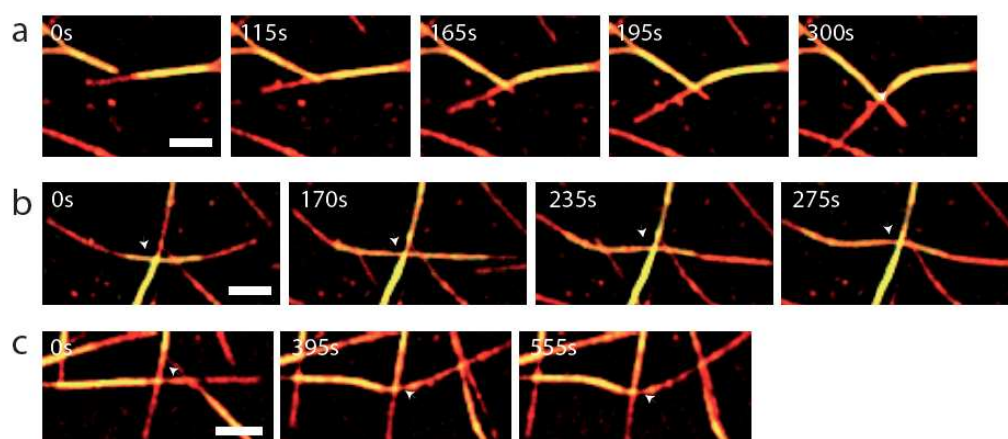
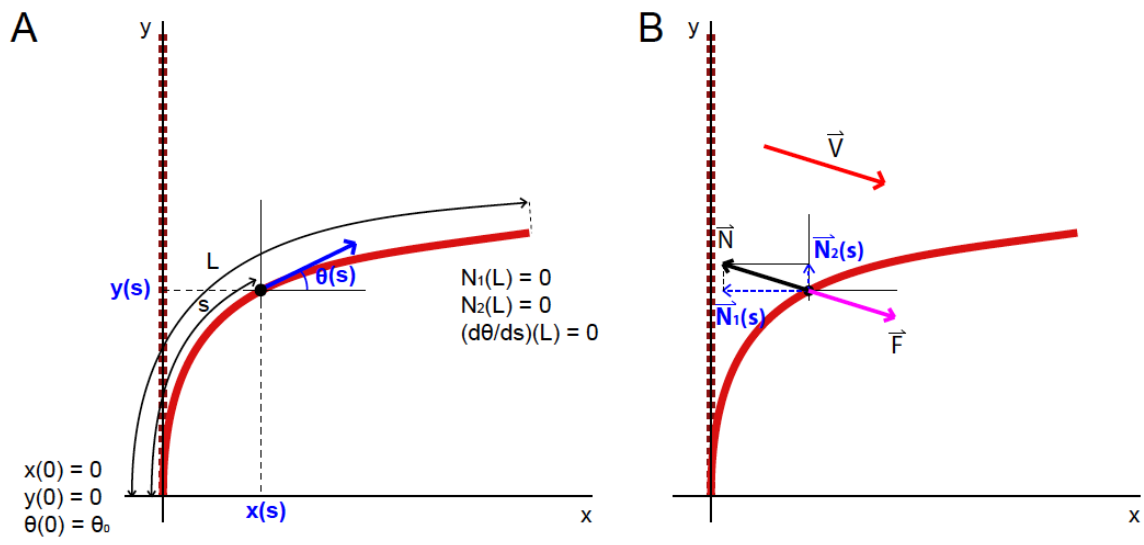


Figure S5



iii. Conclusions et perspectives

Au cours de cette étude, nous avons montré que les MAP65-1 et Ase1 induisent, *in vitro*, le co-alignement de deux MTs et/ou faisceaux de MTs lorsqu'ils se rencontrent à des angles élevés (jusqu'à 45°). Jusqu'ici cette efficacité de co-alignement a été principalement expliquée par la flexibilité de leur domaine d'homodimérisation qui leur permettrait d'explorer un large environnement et donc une homodimérisation efficace à de larges angles (Tulin et al 2012, Janson et al 2007). Dans cette étude, nous montrons que c'est essentiellement l'augmentation de la flexibilité des MTs par MAP65-1 et Ase1 qui leur permet de se déformer lors du co-alignement des MTs pour constituer un faisceau.

La Lp de MTs dynamiques et individuels mesurée dans cette étude est comparable à celle décrite dans la bibliographie (pour revue, Hawkins et al., 2010). En revanche, lorsque les MTs s'assemblent en présence d'Ase1 ou de MAP65-1, nous avons mesuré une Lp 3 à 4 fois inférieure respectivement. Cette propriété semble unique à ces MAP65s car MAP65-4, bien qu'ayant une séquence primaire très homologue, ne modifie pas la Lp des MTs *in vitro*. Cette absence d'effet explique qu'elle ne parvienne pas à co-aligner des MTs et/ou des faisceaux de MTs à des angles supérieurs à 25°. Ce résultat indique que la modification de la flexibilité des MTs est spécifique de l'activité de MAP65-1 et Ase1.

Il est intéressant de constater que l'effet sur la flexibilité des MTs induit par les MAP65-1 et Ase1 est conservé lorsque ces MTs sont organisés en faisceaux. Les faisceaux de MTs organisés par les MAP65-1 ou Ase1 sont en effet trois fois plus rigides que des faisceaux de MTs organisés par la MAP65-4 ou la chimère 1-4. Ces données suggèrent que les MTs, dans les faisceaux générés par MAP65-1 ou Ase1 gardent une « souplesse » comparable à celle des MTs individuels polymérisés en leur présence. Il se peut que les ponts inter-microtubulaires que forment ces MAPs entre les MTs n'empêchent pas les MTs de glisser les uns par rapport aux autres lorsqu'ils sont déformés, n'ayant ainsi que peu d'impact sur l'augmentation de la rigidité du faisceau. En effet il a été montré par Tulin et al., (2013) et Kapitein et al (2008) respectivement, que les MAP65-1 et Ase1 sont capables de diffuser entre deux MTs en organisés en faisceau. De plus, Braun et al., (2011) ont montré que les liens réalisés par ces MAPs entre les MTs n'empêchent pas leur glissement par des moteurs moléculaires et ceci grâce à leur capacité de diffusion sur la lattice des MTs.

Jusqu'ici, plusieurs facteurs ont été décrits pour modifier la Lp des MTs *in vitro* : la longueur des MTs, leur état dynamique, leur état nucléotidique, leur vitesse de polymérisation et la liaison de certaines MAPs comme tau ou MAP2. Cependant aucun de ces paramètres ne

permet d'expliquer la diminution de la Lp des MTs induite par la MAP65-1 ou Ase1. Les MTs observés dans cette étude ont une longueur comprise entre 7 et 16 μm pour les MTs individuels et de 11 à 20 μm pour les faisceaux de MTs. D'après l'étude de Pampaloni et al., (2006) peu de changements de la flexibilité des MTs sont observés pour ces gammes de longueurs. Nous avons déterminé dans notre laboratoire que la vitesse d'élongation des MTs n'est pas modifiée par la présence des MAP65s (Stoppin-Mellet et al., en cours de publication) et les MTs, dont la flexibilité a été mesurés dans cette étude, étaient tous en phase d'élongation. Cela exclut donc une modification de la rigidité des MTs due à la vitesse de polymérisation des MTs ou à leurs comportements dynamiques (Janson et Dogterom, 2004 ; Keller et al., 2008). Pour finir, à l'heure actuelle le mécanisme par lequel tau et MAP2 augmenteraient la rigidité des MTs reste également non compris.

Une modification de la conformation de la tubuline et ainsi des interactions dimères-dimères pourrait expliquer de telles modifications. Certaines équipes ont montré une différence de flexibilité des MTs en comparant différents isoformes de tubulines. Les MTs polymérisés à partir de neurotubuline seraient plus flexibles que des MTs polymérisés à partir de tubuline extraite de cellules MCF7 (Feizabadi et al, 2011). Ces différences peuvent être expliquées par la présence de modifications post-traductionnelles de la tubuline.

Pour expliquer l'effet des MAP65-1 et Ase1 sur la Lp des MTs, l'hypothèse qui nous semble donc la plus pertinente à l'heure actuelle est que ces MAPs, en se liant à la lattice d'un MTs, modifieraient les interactions dimères-dimères dans un protofilament ou entre protofilaments. Nogales et al., (1998) ont montré que les domaines de liaison des MAPs, du taxol et du GTP sont très proches et peuvent influencer la structure du dimère de tubuline. Certaines molécules comme le taxol, sont capables de modifier la conformation d'un dimère de tubuline, ce qui affecte leur M-loop, et ainsi leur interaction longitudinale avec d'autres dimères. Nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle, la liaison de la MAP65-1 ou Ase1 sur la lattice des MTs induirait des modifications semblables.

Pour pouvoir prouver cette hypothèse, il faudrait observer à haute résolution des modifications de la lattice des MTs (interactions latérales et longitudinales entre dimères de tubuline en présence de MAP65-1 ou Ase1). Des premiers essais ont été réalisés en cryomicroscopie électronique en collaboration avec Emmanuelle Neumann (IBS, Grenoble) et Isabelle Arnal (GIN, Grenoble). Cependant comme la MAP65-1 et Ase1 forment des faisceaux denses de MTs, leurs observations en haute résolution est difficile. Une méthodologie plus adaptée que celle que nous avons utilisée devra être développée. Il serait également intéressant d'observer la lattice d'un MT lorsqu'il subit des déformations

importantes lors des évènements de co-alignement. Cela nous permettrait de voir d'éventuels défauts dans la lattice qui permettrait au MT de se courber, cependant à cause des limitations techniques inhérentes à la cryomicroscopie électronique, il est rare d'observer de tels évènements.

Les observations réalisées dans le cadre de cette étude ouvrent de nouvelles perspectives quant à la compréhension de la mécanique des MTs. Il semblerait que la cellule soit capable de modifier la L_p des MTs pour les rendre plus ou moins rigides lorsqu'elle en a besoin. Plus largement, la modulation des propriétés mécaniques des MTs pourrait participer à la plasticité du cytosquelette microtubulaire.

Conclusions et Perspectives

Conclusions et perspectives de mon travail de thèse

L'étude conduite dans le cadre de ma thèse a montré que MAP65-1/Ase1 ont une activité qui va bien au delà d'une protéine qui pontent des MTs avec un espacement contrôlé entre les MTs. La modulation de la flexibilité des MTs doit favoriser leur co-alignement jusqu'à des angles de 45° pour les organiser en faisceaux. De façon générale, l'effet des MAPs sur la flexibilité des MTs reste encore largement méconnu. Seul l'effet de six MAPs sur la Lp des MTs a été étudié, en comptant celles de cette étude alors qu'il en existe des centaines. Les MTs sont des structures connues pour leur rigidité et cette propriété leur permet de résister aux forces de compression et aux différentes forces intracellulaires. Cette propriété est essentielle pour assurer un trafic intracellulaire efficace et également des déformations de la membrane. Cependant, leur Lp apparente *in vivo* est plus faible que celle retrouvée *in vitro*. Pour l'instant les déformations et la flexibilité « anormale » des MTs *in vivo* sont majoritairement expliquées par l'action des forces intracellulaires, la visco-élasticité du milieu, les forces de compression et l'activité de moteurs moléculaires. Nos données montrent qu'il également existe des MAPs comme les MAP65s qui peuvent rendre plus flexibles les MTs. Ceci pourrait en partie expliquer la flexibilité des MTs observée *in vivo*. Il serait donc important d'étudier l'effet d'autres protéines qui interagiraient avec des MTs individuels comme Mor1 et qui pourraient également modifier leurs mécaniques.

La cellule peut avoir besoin d'un réseau très rigide comme dans les cellules neuronales, mais elle peut également avoir besoin d'un réseau plus souple. Ceci lui permettrait par exemple, d'améliorer le comportement de co-alignement des MTs pour établir des jonctions stables sur de courtes distances (ex : fuseau mitotique) ou de pouvoir déformer les MTs pour éviter un obstacle comme la membrane ou un organelle. Rendre les MTs plus flexibles permettrait également d'explorer un espace plus étendu lors du comportement de « recherche et capture ».

Le contrôle spatial de la nucléation de MTs *in vitro* permet de pouvoir non seulement reconstituer des réseaux observés dans la cellule mais également d'étudier la constitution d'un réseau dans des conditions définies (par exemple en variant l'angle de rencontre d'une population de MTs). On pourrait également adapter cette technique pour l'appliquer dans d'autres contextes comme la mesure de la courbure des MTs par un flux ou par un obstacle afin de calculer leur flexibilité.

Cette technique nous a permis de reconstituer un sous-module de la midzone du fuseau

et ainsi de confirmer la synergie entre Ase1 et Klp2 dans la constitution d'un faisceau de MTs stables anti-polaires. L'intérêt de ce dispositif expérimental est que l'étape de nucléation, l'orientation et la polarité des MTs ainsi que la biochimie sont entièrement contrôlées. Ce système peut donc être facilement complexifié et permettre de caractériser les éléments minimaux et essentiels à la constitution d'un réseau de MTs comme observé *in vivo*.

D'autres développements technologiques complémentaires pourraient être réalisés et notamment un système de microfluidique permettant d'apporter dans le dispositif de nouvelles protéines et ainsi d'effectuer un contrôle temporel de l'activité des MAPs sur un réseau de MTs déjà géométriquement contrôlé.

Matériels et Méthodes

Purification de la tubuline

Matériels :

Fractogel EMD SO_3^- , 650 M , Merck

Broyeur

Ultracentrifugeuse Rotor Ti45, Ti70 et TLA 110

Tampon et solution :

Tampon MgCl_2 à 1M

ATP à 0,1 M à pH 7

GTP à 0,1 M

BRB80 : 80 mM PIPES, 1 mM MgCl_2 , 1 mM d'EGTA, pH 6,8 (KOH).

Tampon AB : 0,1 M de PIPES, 0,5 mM MgCl_2 , 2 mM d'EGTA, 0,1 mM d'EDTA, pH 6,8 (KOH).

Glycérol PB : 80 mM de K-PIPES, 5 mM de MgCl_2 , 1 mM d'EGTA, 1 mM de GTP, 33% (v/v) de glycérol.

Coussin de glycérol : tampon BRB80, 60% glycérol.

Tampon CB : 50 mM de PIPES, 1 mM d'EGTA, 0,2 mM de MgCl_2 .

Tampon de régénération : 1 M NaCl, 2 % de Lauryl sarcosine (SLS) dans du tampon CB.

Protocole :

- Entre 3 et 4 cerveaux de bœuf sont collectés dans un abattoir et immédiatement conservés à 4°C dans un sac en plastique contenant du tampon 1,5% NaCl pour éviter la protéolyse des protéines.
- Au labo, les méninges et le cervelet sont enlevés à froid et les cerveaux sont pesés.
- Ils sont mixés à l'aide d'un mixeur à froid pendant 1 min dans du tampon AB (1ml de tampon par g de cerveaux), avec de l'ATP, (10 μl d'ATP à 0,1 M par gramme de cerveaux) et de β -mercaptoéthanol (1 μl de β -mercaptoéthanol à 14,3 M par g de cerveaux).
- Le mélange est clarifié par centrifugation à 160 000 g pendant 1h30 à 4°C (Ti45).

1^{er} cycle de polymérisation :

- Le surnageant est conservé et complété avec 33% de glycérol (v/v), 0,5 mM de GTP, 1,5 mM d'ATP, 3 mM de MgCl₂ final.
- Le mélange est incubé à 37°C pendant 1h afin de permettre la polymérisation des MTs.
- Les MTs assemblés sont ensuite centrifugés à 160 000g pendant 1h15 à 35°C (Ti45).
- Puis le culot est resuspendu dans du tampon AB froid (4 ml/culot) à l'aide d'un potter et les MTs sont dépolymérisés 30 min à 4°C.
- La solution est centrifugée à 200 000 g pendant 30 min à 4°C (Ti70).

2^{ème} cycle de polymérisation :

- Le surnageant est récupéré et complété avec 33% de glycérol (v/v), 1 mM de GTP, 0,5 mM d'ATP, 4 mM de MgCl₂ final.
- Le mélange est incubé à 37°C pendant 1h afin de permettre la polymérisation des MTs.
- Les MTs assemblés sont ensuite centrifugés à 160 000g pendant 1h15 à 35°C (Ti45).
- Puis le culot est resuspendu dans du tampon AB froid (4 ml/culot) à l'aide d'un potter et les MTs sont dépolymérisés 30 min à 4°C.
- La solution est centrifugée à 200 000 g pendant 30 min à 4°C (Ti70).
- La quantité de neurotubuline est mesurée par bradford
- La neurotubuline obtenue peut-être ensuite aliquotée, congelée dans l'azote liquide et stockée à -80° ou utilisée directement pour l'étape de purification.

La purification de la neurotubuline :

- Une colonne échangeuse de cations est équilibrée avec trois volumes de tampon CB, puis lavée avec un volume du tampon CB avec 0,1 mM de GTP.
- La neurotubuline est déposée sur la colonne avec un débit de 0,5 ml/min. Cette étape permettra de séparer les protéines contaminantes de la tubuline. La tubuline ne s'attache pas à la colonne.
- La neurotubuline purifiée est incubée à 37°C pendant 30 min dans du glycérol PB
- Les MTs assemblés sont centrifugés pendant 1 h à 35°C à 200 000g à travers un coussin de glycérol 60% préchauffé à 37°C (Ti70).

- Le culot est resuspendu dans un volume minimal de BRB80 froid et incubé 15 min dans la glace pour induire la dépolymérisation des MTs à l'aide d'un potteur.
- La neurotubuline est ensuite centrifugée à 100 000g pendant 15 min à 4°C (TLA110).
- Puis elle est dosée par Bradford et contrôlée par un gel SDS (10%)
- Elle est aliquotée (20 µl) et congelée dans l'azote liquide puis stockée dans l'azote liquide.

Marquage à la biotine de la tubuline

Matériels :

Ultracentrifuge beckman

Rotor TLA55, TLA 110 et Ti70

Tampons et solutions :

Glycerol PB : 80 mM PIPES, 5 mM MgCl₂, 1 mM ETA, 1 mM GTP, 33% (v/v) glycerol, pH 6,8.

BRB80 : 80 mM PIPES, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, pH 6,8.

Protocole :

- Ajuster la solution de tubuline pour obtenir le tampon glycérol PB, polymériser à 37°C pendant 30 min.
- Dissoudre la biotine à 0,1-0,2 M dans du DMSO.
- Ajouter la biotine à la tubuline. Incuber 20 min à 37°C en mélangeant occasionnellement
- Stopper la réaction en ajoutant du glutamate de potassium à 100 mM.
- Déposer la tubuline sur un coussin de glycérole et centrifuger à 160 000 g pendant 1h15 à 37°C (Ti70).
- Depolymériser les culots des MTs à 4°C dans du BRB80 à l'aide d'un potter.
- Faire un cycle de polym-dépolym (cf purif de tubuline)

Marquage aux fluorochromes de la tubuline

Matériels :

Ultracentrifugeuse beckman

Rotor TLA55, TLA 110 et Ti70

Tampons et solutions :

Coussin HEPES: 0,1 M NaHEPES, pH 6,8, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 60% (v/v) glycérole.

Tampon de resuspension : 0,1 M NaHEPES, pH 8,6, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 40% (v/v) glycérole.

Tampon de blocage : 160 mM PIPES, 2 mM MgCl₂, 2mM EGTA, pH 6,8, 40% glycérole (v/v) plus 100 mM de glutamate de potassium.

Coussin de glycérol : 60 % (v/v) de glycérol, à compléter avec du tampon BRB80.

Protocole :

- Ajuster le tampon de la tubuline pour obtenir le tampon glycérole PB et polymériser à 37°C pendant 30 min.
- Déposer sur un coussin de glycérole préchauffé et centrifuger à 160 000 g pendant 1h15 à 37°C (Ti70).
- Resuspendre le culot de MTs dans le tampon de resuspension (préchauffer à 37°C) (concentration en tubuline environ 50 mg/ml).
- Rajouter 1/10 de volume de 100 mM de NHS-fluorochrome dans du DMSO anhydre en vortexant. Incuber ensuite 10 min à 37°C en vortexant toutes les 2 min.
- Arrêter la réaction et diminuer le pH en ajoutant 2 volumes de tampon de blocage.
- Déposer sur un coussin de glycérole BRB80 et centrifuger à 160 000 g pendant 1h15 (TLA110).
- Depolymériser les culots des MTs à 4°C dans du BRB80 à l'aide d'un potter.
- Faire un cycle de polym-dépolym (cf purif de tubuline)

Expression et purification des MAP65s

Matériels :

Incubateur agitant

Centrifugeuse beckman

Boudin de dialyse 2 ml/cm 12000-14000 Da

Billes Ni-Sepharose

Colonne gel filtration Sephadex S200 16/60

Tampon et solution :

Tampon de lyse : 50 mM NaPi pH 7,9, 200 mM NaCl, 20 mM imidazole, 0,50% de triton, 0,5 mM DTT.

Tampon de lavage : 50 mM NaPi pH 7,9, 100 mM NaCl, 90 mM Imidazole, 0,5 mM DTT.

Tampon d'éluion : 50 mM NaPi pH 7,9, 100 mM NaCl, 500 mM Imidazole, 0,5 mM DTT.

Tampon de Dialyse : 50 mM NaPi pH 7,9, 100 mM NaCl, 0,5 mM DTT.

Protocole :

Expression :

Une pré-culture d'une bactérie compétente Rosetta 2 est incubée à 37°C 45 min dans 20 ml de milieu LB. Puis 20 ml de milieu LB-NaCl sont ajoutés et incubés 45 min à 37°C, puis ajout de nouveau de 20 ml de milieu LB-NaCl. Incuber 45 min à 37°C.

La pré-culture est diluée au 1/200 dans du milieu LB-NaCl et incubée à 37°. Le milieu est alors refroidi 1h à 20° puis 0,5 mM d'IPTG (isopropyl- β -thio-galactoside) sont rajoutés pour induire sur la nuit la protéine à 20°C. Les bactéries sont ensuite centrifugées à 6000 g pendant 30 minutes, puis resuspendues dans 1/50 du volume et recentrifugées à 6000 g pendant 30 min. Le culot peut-être ensuite congelé à -20° ou utilisé directement.

Extraction et purification :

Les bactéries sont resuspendues dans du tampon de lyse (40 ml par culot de bactéries de 1 litre de culture)

Soniquer 2 fois 2 minutes (50% d'intensité) puis centrifuger à 20000 g à 4°C pendant 30 min.

Laver un volume approprié de billes Ni-Sépharose avec du tampon de lyse à 100 G à 4°C (sans frein) pendant 1 à 2 min (1ml pour environ 15-20 mg de protéine).

Les billes sont ensuite incubées avec le supernageant pendant 2h à 4°C sous agitation lente.

Centrifuger les billes à 100 g (sans frein) et les déposer sur la colonne puis passer 50 ml de tampon de lavage, jusqu'à ce que plus aucune protéine ne soit détectée en bradford.

La protéine est ensuite éluée par un tampon d'éluion. Le pic de protéine et la quantité sont ensuite évalués en bradford. L'échantillon est ensuite dialysé durant la nuit dans le tampon de dialyse. Une deuxième étape de purification est effectuée à l'aide d'une gel filtration dans le tampon de dialyse où les fractions contenant la protéine souhaitée sont récupérées. Mesurer de la concentration en bradford, aliquoter et congeler dans l'azote liquide et stocker à -80°C.

Les protéines sont déposées sur gel d'électrophorèse de polyacrylamide (10%) afin de vérifier la qualité de la purification.

Expression et purification d'Ase1

Tampon et solution :

Tampon de lyse : 20 mM NaPi pH 7,9, 500 mM NaCl, 30 mM imidazole, 1% de NP-40.

Tampon de lavage : 20 mM NaPi, 500 mM NaCl, 30 mM Imidazole.

Tampon d'éluion : 20 mM NaPi, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazole.

Tampon de Dialyse : 20 mM NaPi, 500 mM NaCl.

Expression :

Une pré-culture d'une bactérie compétente Rosetta 2 est incubée à 37°C sur la nuit dans du tampon LB. La pré-culture est diluée au 1/100 dans du milieu LB et incubée à 37° jusqu'à ce que la Do atteigne 0,5. Le milieu est alors refroidi 1h à 25° et 0,5 mM d'IPTG (isopropyl- β -thio-galactoside) sont rajoutés pour induire pendant 6h la protéine à 25°C. Les bactéries sont ensuite centrifugées à 6000 g pendant 30 minutes, puis resuspendues dans 1/50 du volume et recentrifugées à 6000 g pendant 30 min. Le culot peut-être ensuite congelé à -20° ou utilisé directement.

L'extraction et la purification sont réalisées dans les mêmes conditions que pour les MAP65s sauf les tampons.

Expression et purification de Klp2

Tampon et solution :

Tampon de lyse : 50 mM NaPi pH 7,4, 2 mM MgCl₂, 0,1 mM ATP, 200 mM NaCl, 0,5% Triton, 1mM de DTT.

Tampon de lavage : 50 mM NaPi, 2 mM MgCl₂, 0,1 mM ATP, 100 mM NaCl, 20 mM Imidazole, 1mM DTT.

Tampon d'éluion : 20 mM NaPi, 2 mM MgCl₂, 0,1 mM ATP, 100 mM NaCl, 250 mM Imidazole, 1 mM DTT.

Tampon de Dialyse : 50 mM NaPi, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 2 mM MgCl₂.

Expression :

Une pré-culture d'une bactérie compétente Rosetta 2 est incubée à 37°C 45 min dans 20 ml de milieu LB. Puis 20 ml de milieu LB-NaCl sont ajoutés et incubés 45 min à 37°C, puis ajout de nouveau de 20 ml de milieu LB-NaCl. Incuber 45 min à 37°C.

La pré-culture est diluée au 1/200 dans du milieu LB NaCl et incubée à 37° jusqu'à ce que la Do atteigne 0,5. Le milieu est alors refroidi 1h à 15° et 0,5 mM d'IPTG (isopropyl-β-thio-galactoside) sont rajoutés pour induire pendant 16h la protéine à 15°C. Les bactéries sont ensuite centrifugées à 6000 g pendant 30 minutes, puis resuspendues dans 1/50 du volume et recentrifugées à 6000 g pendant 30 min. Le culot peut-être ensuite congelé à -20° ou utilisé directement.

L'extraction et la purification sont réalisées dans les mêmes conditions que pour les MAP65s, sauf les tampons.

Mesure de l'activité ATPase de Klp2

Matériels :

Spectrophotomètre Safas UV mc₂

Tampon et solution :

Tampon ATPase : 25 mM ACES (pH 6,9), 2 mM magnésium acetate, 2 mM potassium-EGTA, 0,1 mM potassium EDTA, 1mM 2-mercaptoethanol/1 mM ATP, 2 mM phosphoenolpyruvate, 0,25 mM NADH, 5 µg/ml pyruvate kinase, 3 µg/ml lactate dehydrogenase.

Protocole :

- Equilibration du Mix
- Ajout de différentes concentrations de Klp2 dans du Tampon ATPase
- Au bout de quelques minutes 2,5 µM de MTs sont rajoutés
- Suivie de l'absorbance à 340 nm.

Mesure du Kd des MAPs

Matériels :

Spectrofluorimètre Safas Xenius

Ultracentrifuge Bekman

Cloche à vide

Tampon et solution :

Tampon MAPs : 50 mM NaPi, pH 7,9, 0,1 M NaCl, 0,5 mM DTT.

Protocole :

- Silaniser des tubes épendorf 1,5 ml, 1h sous vide avec 2,85 mL de Trichloroéthylène silane et 150 µl de dichlorodiméthylsilane.
- laver à l'éthanol.
- laver à l'eau milliQ et sécher les tubes à l'air comprimé.
- Les MTs taxolés ont été obtenues en incubant 10 µM de tubuline avec 1 mM de GTP et 10 µM de taxol dans du BRB80 durant 2h.
- Les MAPs ont été incubées à différentes concentrations avec une concentration fixe de MTs stabilisés durant 30 min à température ambiante.
- Le mélange MAPs/MTs a été ensuite centrifugé 20 min à 100,000 g à 25°C.
- Le supernatant est conservé et le culot resuspendu dans du tampon BRB/MAP 0,5M NaCl.
- La quantité de fluorescence du culot et du supernatant a ensuite été mesurée en spectrofluorométrie (excitation à 490 nm, émission à 512 nm).

Polymérisation d'amorces stables de MTs

Matériels :

Ultracentrifugeuse Beckman, rotor TLA55.

Tampons et solutions :

BRB80 : 80 mM PIPES, pH 6.8, 1 mM EGTA 1mM MgCl₂.

DTT (Sigma) : solution stock de 1 M dilué dans de l'eau MilliQ.

GMPCPP (Jenabioscience) : Solution stock de 10 mM.

Taxol (paclitaxel, Sigma T1912) : Stock à 25 mM dans du DMSO.

Les amorces longues :

- Polymérisation d'amorces d'une longueur d'environ 3 à 5 μm .

- Dans du BRB80, avec 0,5 mM GMPCPP et 1 mM DTT.

7 μM de tubuline biotinylée + 3 μM de tubuline ATTO-561

- Polymériser 1h à 37°C
- Ajouter 4 μM de taxol final
- Incuber 30 min à 37°C
- Centrifuger 5 min à 100000 g
- Resuspendre le culot dans du BRB80, 0,5 mM de GMPCPP, 1 mM DTT et 4 μM de taxol.
- Aliquoter et congeler dans l'azote liquide.
- Stocker dans l'azote liquide

Préparation de micro-amorces stables de MTs :

- Dans du BRB80, avec 0,5 mM GMPCPP, 1 mM DTT et 20 μM de taxol. 45 μM de tubuline biotinylée + 5 μM de tubuline ATTO-561
- Polymériser 10 min à 37°C (à utiliser directement pour attacher sur les micro-patterns).

Fonctionnalisation des lames et lamelles :

Matériels :

Cuves en verres (Dutscher)

Portoir plastique

Solutions :

Acétone

Ethanol (96,5°)

Eau MilliQ

Hellmanex III (Hellma), à 2% dilué dans de l'eau MilliQ

Silane-PEG (30K) CreativePEGWork

Silane PEG-Biotine (30K) laysan

Lavage et activation

- 30 min dans de l'acétone
- 10 min dans de l'éthanol
- Lavages à l'eau MilliQ
- 2h à température ambiante dans de l'hellmanex III
- Lavages à l'eau MilliQ
- Séchage à air comprimé
- Plasma 3 min à 60 Watts

Les lames et lamelles silane-PEG :

- Dissoudre à 1 mg/ml de silane-PEG ou silane-PEG-Biotine dans de l'éthanol (96,5°) avec 0,1% (V/V) HCL (37%).

- Chauffer à 60° jusqu'à dissolution totale de la poudre.

Incuber les lames et lamelles après activation au plasma dans la solution de silane-PEG, 18H à température ambiante sous agitation.

- Laver les lames et lamelles dans l'éthanol (96,5°)
- Laver dans l'eau MilliQ
- Sécher à l'air comprimé.
- Stocker à l'abri de la poussière et de l'humidité à 4°C.

Le micro-patterning :

Matériels :

UV cleaner

Photomask (Toppan)

Support métallique permettant de faire le vide

Protocoles :

- Placer en sandwich les lamelles silane-PEG (30K) entre le photomask et le support métallique.
- Préchauffer la lampe 5 min
- Exposer aux UV la lamelle à travers le photomask durant 45 secondes.

Préparation des chambres de perfusion :

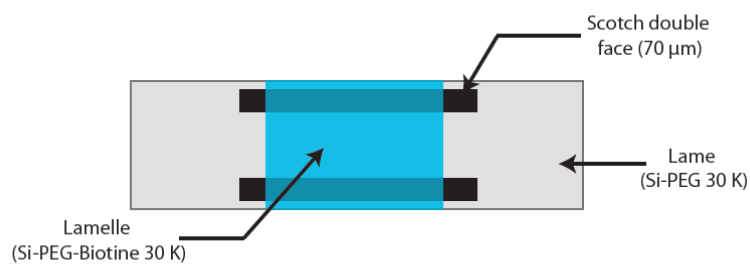
Matériels :

Lames silane-PEG

Lamelles Silane-PEG ou silane-PEG-Biotine

Scotch double face (Lima)

Coller deux scotchs sur la lamelle sur la longueur de la lame séparés d'un centimètre l'un de l'autre. Puis coller la lamelle sur le scotch (voir schéma ci-dessous).

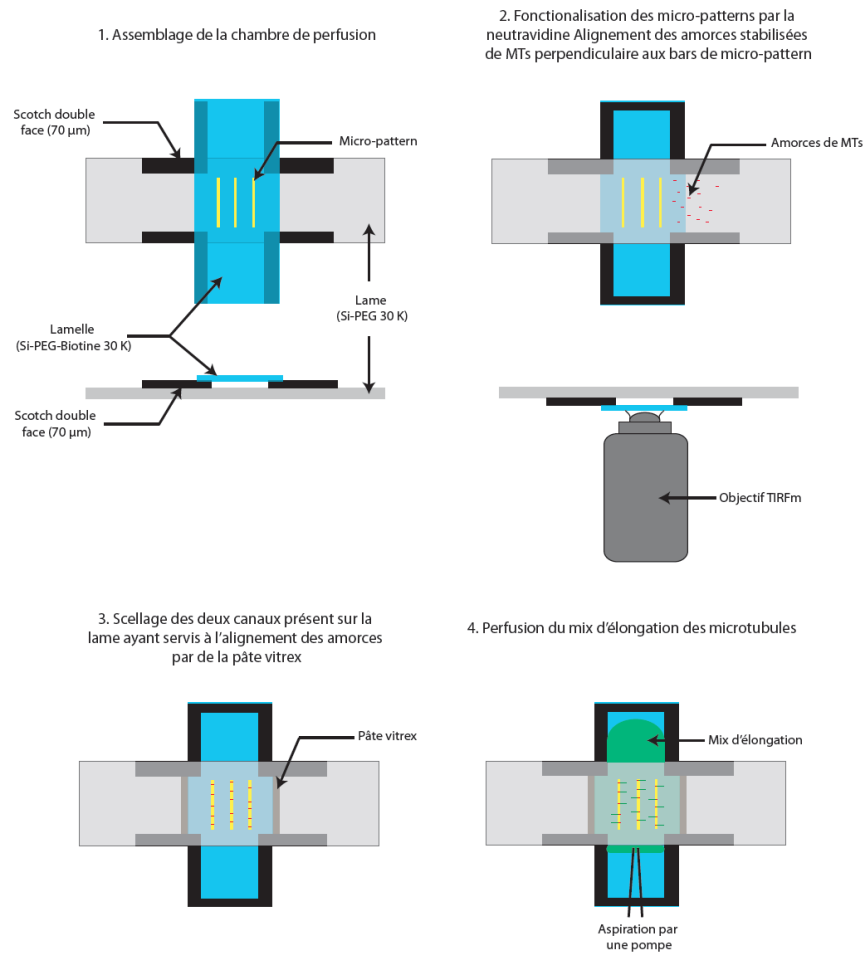


Pour la flexibilité :

Découper du scotch double face pour former des équerres de 1 centimètre.

Coller 4 scotchs sur la lame en les espaçant de 1 centimètre pour former une chambre de perfusion à deux entrées et deux sorties.

Coller la lamelle perpendiculairement à la lame (Voir schema ci-dessous).



Préparation de l'échantillon :

Tampon et solution :

BRB80 : 80 mM PIPES, 1 mM MgCl₂, 1 mM d'EGTA, pH 6,8 (KOH).

Tampon MAP : 100 mM NaPi, 0,5 mM DTT à pH 7.9

PLL29K-G35-PEG2K (Jenkem technology) : 0,1 mg/ml dans de l'HEPES 10 mM, pH 7,4

Solution de neutravidine : 25 µg/ml de neutravidine (Sigma) dans du BRB80 + 0,5% de BSA (Sigma).

Tampon de lavage : BRB80 + 0,5 % de BSA.

Anti-fading : Tampon MAP 3x, DTT à 40 mM, glucose à 1,2 mg/ml, catalase à 80 µg/ml de catalase, glucose oxydase à 0,4 mg/ml final.

BSA : Stock à 10 % dans du PBS.

GTP : Stock à 10 mM dans de l'eau MilliQ.

Methyl cellulose (1500 centipoise, Sigma) : dissous à 2% dans de l'eau MilliQ.

Pour les évènements de rencontre

Protocoles :

- Assembler une chambre de perfusion avec une lame silane-PEG et une lamelle silane-PEG-Biotine, avec du scotch double face (70 µm).
- Perfuser une solution de BRB80, à 25 µg/ml de neutravidine et 0,5% BSA.
- Perfuser du Pll-PEG à 0,1 mg/ml.
- Laver 10 fois le volume de la chambre de perfusion avec le tampon de lavage.
- Perfuser des amorces de MTs de 2 à 5 µm de longueur dans du BRB80.
- Laver 10 fois le volume de la chambre de perfusion avec le tampon de lavage.
- Perfuser le mix d'élongation contenant dans du BRB80 : l'anti-fading dilué au 1/10, le GTP dilué au 1 /10, le tampon MAP dilué au 1/3, la méthyl cellulose à 0,05% final, la BSA à 0,5 % final, et 22 µM de tubuline (dont 5 µM de tubuline Marquée ATTO-X).

Pour le micro-patterning :

- Assembler une chambre de perfusion avec une lame silane-PEG (30K, CreativePegWork) et une lamelle silane-PEG patternée, avec du scotch double face (70 µm).
- Perfuser une solution de BRB80, à 25 µg/ml de neutravidine.

- Perfuser du PLL-PEG à 0,1 mg/ml.
- Laver 10 fois le volume de la chambre de perfusion avec le tampon de lavage.
- Perfuser les micro-amorces de MTs dans du BRB80.
- Laver 10 fois le volume de la chambre de perfusion avec le tampon de lavage.
- Perfuser le mix d'élongation contenant dans du BRB80 : l'anti-fading dilué au dixième, le GTP dilué au 1 /10, le tampon MAP dilué au 1/3, la méthyl cellulose à 0,05% final, la BSA à 0,5 % final, et 15 μ M de tubuline (dont 3 μ M de tubuline Marquée ATTO-X).

Passivation des billes :

Matériels : Centrifugeuse de paillasse, billes Alexa-561 (Bioprob)

Protocole :

- Dilution au 1/100 des billes dans une solution de silane-PEG (30K), durant 2h
- Centrifuger à 7,4 g 2 min
- Resuspendre dans le même volume les billes dans une solution de PLL-PEG pendant 2h
- Diluer dans du tampon BRB80
- Centrifuger à 7,4 g pendant 2 min
- Resuspendre dans du BRB80

Pour la flexibilité :

- Assembler une chambre de perfusion avec une lame silane-PEG et une lamelle silane-PEG patternée, avec du scotch double face (70 μ m) selon le schema X.
- Perfuser une solution de BRB80, à 25 μ g/ml de neutravidine.
- Perfuser du PLL-PEG à 0,1 mg/ml.
- Laver 10 fois le volume de la chambre de perfusion avec le tampon de lavage.
- Perfuser les micro-amorces de MTs dans du BRB80.
- Laver 10 fois le volume de la chambre de perfusion avec le tampon de lavage.
- Perfuser le mix d'élongation contenant dans du BRB80 : l'anti-fading dilué au dixième, le GTP dilué au 1 /10, le tampon MAP dilué au 1/3, la méthyl cellulose à 0,05% final, la BSA à 0,5 % final, des billes diluées au 1/10, et 15 μ M de tubuline (dont 3 μ M de tubuline Marquée ATTO-X).

- Lorsque les Mts ont atteint une taille de 10 μm , déposer en amont le mix d'élongation et engager le flux à l'aide de la pompe en aval de la chambre de perfusion

L'imagerie TIRFm

Le microscope :

Microscope TIRF azimuthal ilas2 (Nikon eclipse Ti, modifié par Roper Scientific) équipé d'une caméra Evolve 512 (Photometrics).

Un contrôleur de température MC60 de chez LINKAM.

L'excitation des échantillons a été faite par des lasers 491 nm et 561 nm (Optical Insights).

Le logiciel (métamorph)

Les images et séries d'images ont été obtenues par le logiciel Metamorph® (version 7.7.5, Universal Imaging). Les séries d'images ont été prises toutes les 5 secondes pendant 30 min, sauf pour les expériences de flexibilité où les images ont été prises toutes les 315 ms pendant 90 secondes. Les images ont été traitées pour améliorer le ratio signal sur bruit (Equalize light, les filtres low pass et flatten background).

L'analyse de la flexibilité

La vitesse des billes dans le milieu a été mesurée par imageJ en utilisant le plugin MTrackJ.

La courbure des MTs a été mesurée par imageJ en utilisant le plugin Jfilament.

Les simulations pour calculer la L_p des MTs ont été réalisées avec un programme développé par Marcelo Zoccholer et Jean-Louis Martiel sous Matlab.

Références

- Ahmad FJ, Echeverri CJ, Vallee RB, Baas PW (1998). Cytoplasmic dynein and dynactin are required for the transport of microtubules into the axon. *J Cell Biol.* 140(2):391-401.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1994) *Molecular Biology of the Cell.* 3rd edition.
- Ambrose JC, Wasteney GO (2008). CLASP modulates microtubule-cortex interaction during self-organization of acentrosomal microtubules. *Mol Biol Cell.* 19(11):4730-7.
- Ambrose JC, Cyr R (2007). The kinesin ATK5 functions in early spindle assembly in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 19(1):226-36.
- Ambrose JC, Li W, Marcus A, Ma H, Cyr R (2005). A minus-end-directed kinesin with plus-end tracking protein activity is involved in spindle morphogenesis. *Mol Biol Cell.* 16(4):1584-92.
- Ambrose JC, Wasteney GO (2008). CLASP modulates microtubule-cortex interaction during self-organization of acentrosomal microtubules. *Mol Biol Cell.* 19(11):4730-7.
- Antin PB, Forry-Schaudies S, Friedman TM, Tapscott SJ, Holtzer H (1981). Taxol induces postmitotic myoblasts to assemble interdigitating microtubule-myosin arrays that exclude actin filaments. *J Cell Biol.* 90(2):300-8.
- Arnal I, Heichette C, Diamantopoulos GS, Chrétien D (2004). CLIP-170/tubulin-curved oligomers coassemble at microtubule ends and promote rescues. *Curr Biol.* 14(23):2086-95.
- Ault JG, Nicklas RB (1989). Tension, microtubule rearrangements, and the proper distribution of chromosomes in mitosis. *Chromosoma.* 98(1):33-9.
- Baas PW, Black MM, Banker GA (1989). Changes in microtubule polarity orientation during the development of hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol.* 109(6 Pt 1):3085-94.
- Baas PW, Deitch JS, Black MM, Banker GA (1988). Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(21):8335-9.
- Baas PW, Karabay A, Qiang L (2005). Microtubules cut and run. *Trends Cell Biol.* 15(10):518-24.
- Baba SA (1972). Flexural rigidity and elastic constant of cilia. *J Exp Biol.* 56(2):459-67.
- Bannigan A, Lizotte-Waniewski M, Riley M, Baskin TI (2008). Emerging molecular mechanisms that power and regulate the anastral mitotic spindle of flowering plants. *Cell Motil Cytoskeleton.* 65(1):1-11.
- Bartolini F, Gundersen GG (2006). Generation of noncentrosomal microtubule arrays. *J Cell Sci.* 119(Pt 20):4155-63.

- Baskin TI (2001). On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: a review and a model. *Protoplasma*. 215(1-4):150-71.
- Basto R, Lau J, Vinogradova T, Gardiol A, Woods CG, Khodjakov A, Raff JW (2006). Flies without centrioles. *Cell*. 125(7):1375-86.
- Becker BE, Cassimeris L (2005). Cytoskeleton: microtubules born on the run. *Curr Biol*. 15(14):R551-4.
- Bieling P, Telley IA, Surrey T (2010). A minimal midzone protein module controls formation and length of antiparallel microtubule overlaps. *Cell*. 142(3):420-32.
- Bicek AD, Tüzel E, Demtchouk A, Uppalapati M, Hancock WO, Kroll DM, Odde DJ (2009). Anterograde microtubule transport drives microtubule bending in LLC-PK1 epithelial cells. *Mol Biol Cell*. 20(12):2943-53.
- Bicek AD, Tüzel E, Kroll DM, Odde DJ (2007). Analysis of microtubule curvature. *Methods Cell Biol*. 83:237-68.
- Brangwynne CP, MacKintosh FC, Kumar S, Geisse NA, Talbot J, Mahadevan L, Parker KK, Ingber DE, Weitz DA (2006). Microtubules can bear enhanced compressive loads in living cells because of lateral reinforcement. *J Cell Biol*. 173(5):733-41.
- Braun M, Lansky Z, Fink G, Ruhnnow F, Diez S, Janson ME (2011). Adaptive braking by Ase1 prevents overlapping microtubules from sliding completely apart. *Nat Cell Biol*. 13(10):1259-64.
- Braun M, Drummond DR, Cross RA, McAinsh AD (2009). The kinesin-14 Klp2 organizes microtubules into parallel bundles by an ATP-dependent sorting mechanism. *Nat Cell Biol*. 11(6):724-30.
- Brust-Mascher I, Scholey JM (2002). Microtubule flux and sliding in mitotic spindles of *Drosophila* embryos. *Mol Biol Cell*. 13(11):3967-75.
- Bugnard E, Zaal KJ, Ralston E (2005). Reorganization of microtubule nucleation during muscle differentiation. *Cell Motil Cytoskeleton*. 60(1):1-13.
- Carazo-Salas RE, Antony C, Nurse P (2005). The kinesin Klp2 mediates polarization of interphase microtubules in fission yeast. *Science*. 309(5732):297-300.
- Chan J, Calder G, Fox S, Lloyd C (2005). Localization of the microtubule end binding protein EB1 reveals alternative pathways of spindle development in *Arabidopsis* suspension cells. *Plant Cell*. 17(6):1737-48. Epub 2005 May 6.
- Chan J, Jensen CG, Jensen LC, Bush M, Lloyd CW (1999). The 65-kDa carrot microtubule-associated protein forms regularly arranged filamentous cross-bridges between microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(26):14931-6.
- Chan J, Sambade A, Calder G, Lloyd C (2009). *Arabidopsis* cortical microtubules are initiated along, as well as branching from, existing microtubules. *Plant Cell*. 21(8):2298-306.

- Chang F (2001). Establishment of a cellular axis in fission yeast. *Trends Genet.* 17(5):273-8.
- Chang F, Martin SG (2009). Shaping fission yeast with microtubules. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1(1):a001347.
- Chang F, Peter M (2003). Yeasts make their mark. *Nat Cell Biol.* 5(4):294-9.
- Carazo-Salas RE, Nurse P (2006). Self-organization of interphase microtubule arrays in fission yeast. *Nat Cell Biol.* 8(10):1102-7.
- Cassimeris L, Gard D, Tran PT, Erickson HP (2001). XMAP215 is a long thin molecule that does not increase microtubule stiffness. *J Cell Sci.* 114(Pt 16):3025-33.
- Chrétien D, Fuller SD, Karsenti E (1995). Structure of growing microtubule ends: two-dimensional sheets close into tubes at variable rates. *J Cell Biol.* 129(5):1311-28.
- Chrétien D, Metz F, Verde F, Karsenti E, Wade RH (1992). Lattice defects in microtubules: protofilament numbers vary within individual microtubules. *J Cell Biol.* 117(5):1031-40.
- Chrétien D, Wade RH (1991). New data on the microtubule surface lattice. *Biol Cell.* 71(1-2):161-74.
- Conde C, Cáceres A (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci.* 10(5):319-32.
- Cosentino Lagomarsino M, Tanase C, Vos JW, Emons AM, Mulder BM, Dogterom M (2007). Microtubule organization in three-dimensional confined geometries: evaluating the role of elasticity through a combined *in vitro* and modeling approach. *Biophys J.* 92(3):1046-57.
- Cullen CF, Ohkura H (2001). Msp1 protein is localized to acentrosomal poles to ensure bipolarity of *Drosophila* meiotic spindles. *Nat Cell Biol.* 3(7):637-42.
- De Forges H, Bouissou A, Perez F (2012). Interplay between microtubule dynamics and intracellular organization. *Int J Biochem Cell Biol.* 44(2):266-74.
- Dixit R, Cyr R (2004). Encounters between dynamic cortical microtubules promote ordering of the cortical array through angle-dependent modifications of microtubule behavior. *Plant Cell.* 16(12):3274-84.
- Donhauser ZJ, Jobs WB, Binka EC (2010). Mechanics of microtubules: effects of protofilament orientation. *Biophys J.* 99(5):1668-75.
- Dye RB, Fink SP, Williams RC Jr (1993). Taxol-induced flexibility of microtubules and its reversal by MAP-2 and Tau. *J Biol Chem.* 268(10):6847-50.
- Ehrhardt DW, Shaw SL (2006). Microtubule dynamics and organization in the plant cortical array. *Annu Rev Plant Biol.* 57:859-75.
- Elie-Caille C, Severin F, Helenius J, Howard J, Muller DJ, Hyman AA (2007). Straight GDP-tubulin protofilaments form in the presence of taxol. *Curr Biol.* 17(20):1765-70.

- Endow S.A, Chandra R, Komma D.J, Yamamoto A.H and Salmon E.D (1994). Mutants of the drosophila *ncd* microtubule motor protein cause centrosomal and spindle pole defects in mitosis. *Journal of Cell Science*. 107, 859-867 (1994).
- Erickson HP (1974). Microtubule surface lattice and subunit structure and observations on reassembly. *J Cell Biol*. 60(1):153-67.
- Evans L, Mitchison T, Kirschner M (1985). Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules. *J Cell Biol*. 100(4):1185-91.
- Fache V, Gaillard J, Van Damme D, Geelen D, Neumann E, Stoppin-Mellet V, Vantard M (2010). Arabidopsis kinetochore fiber-associated MAP65-4 cross-links microtubules and promotes microtubule bundle elongation. *Plant Cell*. 22(11):3804-15.
- Fan J, Griffiths AD, Lockhart A, Cross RA, Amos LA (1996). Microtubule minus ends can be labelled with a phage display antibody specific to alpha-tubulin. *J Mol Biol*. 259(3):325-30.
- Felgner H, Frank R, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E, Ludin B, Matus A, Schliwa M (1997). Domains of neuronal microtubule-associated proteins and flexural rigidity of microtubules. *J Cell Biol*. 138(5):1067-75.
- Felgner H, Frank R, Schliwa M (1996). Flexural rigidity of microtubules measured with the use of optical tweezers. *J Cell Sci*. 109 (Pt 2):509-16.
- Fink G, Hajdo L, Skowronek KJ, Reuther C, Kasprzak AA, Diez S (2009). The mitotic kinesin-14 *Ncd* drives directional microtubule-microtubule sliding. *Nat Cell Biol*. 11(6):717-23.
- Gadde S, Heald R (2004). Mechanisms and molecules of the mitotic spindle. *Curr Biol*. 14(18):R797-805.
- Gaillard J, Neumann E, Van Damme D, Stoppin-Mellet V, Ebel C, Barbier E, Geelen D, Vantard M (2008). Two microtubule-associated proteins of Arabidopsis MAP65s promote antiparallel microtubule bundling. *Mol Biol Cell*. 19(10):4534-44.
- Gardiner JC, Harper JD, Weerakoon ND, Collings DA, Ritchie S, Gilroy S, Cyr RJ, Marc J (2001). A 90-kD phospholipase D from tobacco binds to microtubules and the plasma membrane. *Plant Cell*. 13(9):2143-58.
- Gardiner JC, Taylor NG, Turner SR (2003). Control of cellulose synthase complex localization in developing xylem. *Plant Cell*. 15(8):1740-8.
- Gigant B, Curmi PA, Martin-Barbey C, Charbaut E, Lachkar S, Lebeau L, Siavoshian S, Sobel A, Knossow M (2000). The 4 A X-ray structure of a tubulin:stathmin-like domain complex. *Cell*. 102(6):809-16.
- Gittes F, Mickey B, Nettleton J, Howard J (1993). Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J Cell Biol*. 120(4):923-34.

- Giunta KL, Jang JK, Manheim EA, Subramanian G, McKim KS (2002). Subito encodes a kinesin-like protein required for meiotic spindle pole formation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 160(4):1489-501.
- Goshima G and Scholey J.M. (2010). Control of mitotic spindle length. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26:21–57
- Goshima G, Nédélec F, Vale RD (2005). Mechanisms for focusing mitotic spindle poles by minus end-directed motor proteins. *J Cell Biol.* 171(2):229-40.
- Goodwin SS, Vale RD (2010). Patronin regulates the microtubule network by protecting microtubule minus ends. *Cell.* 143(2):263-74.
- Grigoriev I, Borisy G, Vorobjev I (2006). Regulation of microtubule dynamics in 3T3 fibroblasts by Rho family GTPases. *Cell Motil Cytoskeleton.* 63(1):29-40.
- Gruneberg U, Neef R, Li X, Chan EH, Chalamalasetty RB, Nigg EA, Barr FA (2006). KIF14 and citron kinase act together to promote efficient cytokinesis. *J Cell Biol.* 172(3):363-72.
- Gundersen GG (2002). Evolutionary conservation of microtubule-capture mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3(4):296-304.
- Gundersen GG, Gomes ER, Wen Y (2004). Cortical control of microtubule stability and polarization. *Curr Opin Cell Biol.* 16(1):106-12.
- Hamada T (2007). Microtubule-associated proteins in higher plants. *J Plant Res.* 120(1):79-98.
- Hawkins T, Mirigian M, Selcuk Yasar M, Ross JL (2010). Mechanics of microtubules. *J Biomech.* 43(1):23-30.
- Hayles J, Nurse P (2001). A journey into space. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(9):647-56.
- He Y, Francis F, Myers KA, Yu W, Black MM, Baas PW (2005). Role of cytoplasmic dynein in the axonal transport of microtubules and neurofilaments. *J Cell Biol.* 168(5):697-703.
- Hentrich C, Surrey T (2010). Microtubule organization by the antagonistic mitotic motors kinesin-5 and kinesin-14. *J Cell Biol.* 189(3):465-80.
- Ho CM, Lee YR, Kiyama LD, Dinesh-Kumar SP, Liu B (2012). Arabidopsis Microtubule-Associated Protein MAP65-3 Cross-Links Antiparallel Microtubules toward Their Plus Ends in the Phragmoplast via Its Distinct C-Terminal Microtubule Binding Domain. *Plant Cell.* 24(5):2071-85.
- Höög JL, Schwartz C, Noon AT, O'Toole ET, Mastronarde DN, McIntosh JR, Antony C (2007). Organization of interphase microtubules in fission yeast analyzed by electron tomography. *Dev Cell.* 12(3):349-61.
- Hoogenraad CC, Bradke F (2009). Control of neuronal polarity and plasticity--a renaissance for microtubules? *Trends Cell Biol.* 19(12):669-76.

- Horio T, Hotani H (1986). Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy. *Nature*. 321(6070):605-7.
- Hoyt MA, He L, Totis L, Saunders WS (1993). Loss of function of *Saccharomyces cerevisiae* kinesin-related CIN8 and KIP1 is suppressed by KAR3 motor domain mutations. *Genetics*. 135(1):35-44.
- Hussey PJ, Hawkins TJ, Igarashi H, Kaloriti D, Smertenko A (2002). The plant cytoskeleton: recent advances in the study of the plant microtubule-associated proteins MAP-65, MAP-190 and the *Xenopus* MAP215-like protein, MOR1. *Plant Mol Biol*. 50(6):915-24.
- Ishijima S, Hiramoto Y (1994). Flexural rigidity of echinoderm sperm flagella. *Cell Struct Funct*. 19(6):349-62.
- Janson ME, Dogterom M (2004). A bending mode analysis for growing microtubules: evidence for a velocity-dependent rigidity. *Biophys J*. 87(4):2723-36.
- Janson ME, Loughlin R, Loiodice I, Fu C, Brunner D, Nédélec FJ, Tran PT (2007). Crosslinkers and motors organize dynamic microtubules to form stable bipolar arrays in fission yeast. *Cell*. 128(2):357-68.
- Janson ME, Setty TG, Paoletti A, Tran PT (2005). Efficient formation of bipolar microtubule bundles requires microtubule-bound gamma-tubulin complexes. *J Cell Biol*. 169(2):297-308.
- Jaworski J, Kapitein LC, Gouveia SM, Dortland BR, Wulf PS, Grigoriev I, Camera P, Spangler SA, Di Stefano P, Demmers J, Krugers H, Defilippi P, Akhmanova A, Hoogenraad CC (2009). Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity. *Neuron*. 61(1):85-100.
- Jiang CJ, Sonobe S (1993) Identification and preliminary characterization of a 65 kDa higher-plant microtubule-associated protein. *J Cell Sci* 105:891–901.
- Jiang, W., Jimenez, G., Wells, N.J., Hope, T.J., Wahl, G.M., Hunter, T., Fukunaga, R. (1998). PRC1: A human mitotic spindle-associated CDK substrate protein required for cytokinesis. *Mol. Cell* 2, 877–885.
- Job D, Valiron O, Oakley B. Microtubule nucleation (2003). *Curr Opin Cell Biol*. 15(1):111-7.
- Juanes MA, ten Hoopen R, Segal M (2011). Ase1p phosphorylation by cyclin-dependent kinase promotes correct spindle assembly in *S. cerevisiae*. *Cell Cycle*. 10(12):1988-97.
- Kapitein LC, Hoogenraad CC (2010). Which way to go? Cytoskeletal organization and polarized transport in neurons. *Mol Cell Neurosci*. 46(1):9-20.
- Kapitein LC, Janson ME, van den Wildenberg SM, Hoogenraad CC, Schmidt CF, Peterman EJ (2008). Microtubule-driven multimerization recruits ase1p onto overlapping microtubules. *Curr Biol*. 18(21):1713-7.

- Kapitein LC, Peterman EJ, Kwok BH, Kim JH, Kapoor TM, Schmidt CF (2005). The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks. *Nature*. 435(7038):114-8.
- Kar S, Fan J, Smith MJ, Goedert M, Amos LA (2003). Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol. *EMBO J*. 22(1):70-7.
- Karabay A, Walker RA (1999). Identification of microtubule binding sites in the Ncd tail domain. *Biochemistry*. 38(6):1838-49.
- Kawaguchi K, Yamaguchi A (2010). Temperature dependence rigidity of non-taxol stabilized single microtubules. *Biochem Biophys Res Commun*. 402(1):66-9.
- Kawamura E, Wasteneys GO (2008). MOR1, the *Arabidopsis thaliana* homologue of Xenopus MAP215, promotes rapid growth and shrinkage, and suppresses the pausing of microtubules *in vivo*. *J Cell Sci*. 121(Pt 24):4114-23.
- Keating TJ, Peloquin JG, Rodionov VI, Momcilovic D, Borisy GG (1997). Microtubule release from the centrosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(10):5078-83.
- Keller PJ, Pampaloni F, Lattanzi G, Stelzer EH (2008). Three-dimensional microtubule behavior in Xenopus egg extracts reveals four dynamic states and state-dependent elastic properties. *Biophys J*. 95(3):1474-86.
- Keating TJ, Borisy GG (1999). Centrosomal and non-centrosomal microtubules. *Biol Cell*. 91(4-5):321-9.
- Khodjakov A, Cole RW, Oakley BR, Rieder CL (2000). Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates. *Curr Biol*. 10(2):59-67.
- Kikumoto M, Kurachi M, Tosa V, Tashiro H (2006). Flexural rigidity of individual microtubules measured by a buckling force with optical traps. *Biophys J*. 90(5):1687-96.
- Kirschner MW, Honig LS, Williams RC (1975). Quantitative electron microscopy of microtubule assembly *in vitro*. *J Mol Biol*. 99(2):263-76.
- Knop M, Schiebel E (1997). Spc98p and Spc97p of the yeast gamma-tubulin complex mediate binding to the spindle pole body via their interaction with Spc110p. *EMBO J*. 16(23):6985-95.
- Kollman JM, Merdes A, Mourey L, Agard DA (2011). Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 12(11):709-21.
- Kurachi M, Hoshi M, Tashiro H (1995). Buckling of a single microtubule by optical trapping forces: direct measurement of microtubule rigidity. *Cell Motil Cytoskeleton*. 30(3):221-8.
- Kurasawa Y, Earnshaw WC, Mochizuki Y, Dohmae N, Todokoro K (2004). Essential roles of KIF4 and its binding partner PRC1 in organized central spindle midzone formation. *EMBO J*. 23(16):3237-48.

- Landau LD, Lifshitz EM, Kosevich AM, Pitaevskii LP (1986) Theory of elasticity, 3rd edition.
- Lechler T, Fuchs E (2007). Desmoplakin: an unexpected regulator of microtubule organization in the epidermis. *J Cell Biol.* 176(2):147-54.
- Ledbetter MC, Porter KR (1964). Morphology of Microtubules of Plant Cell. *Science.* 144(3620):872-4.
- Li H, Zeng X, Liu ZQ, Meng QT, Yuan M, Mao TL (2009). Arabidopsis microtubule-associated protein AtMAP65-2 acts as a microtubule stabilizer. *Plant Mol Biol.* 69(3):313-24.
- Lippincott-Schwartz J, Cole NB (1995). Roles for microtubules and kinesin in membrane traffic between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex. *Biochem Soc Trans.* 23(3):544-8.
- Liverpool TB (2006). Active gels: where polymer physics meets cytoskeletal dynamics. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci.* 364(1849):3335-55.
- Liu B, Marc J, Joshi HC, Palevitz BA (1993). A gamma-tubulin-related protein associated with the microtubule arrays of higher plants in a cell cycle-dependent manner. *J Cell Sci.* 104 (Pt 4):1217-28.
- Lloyd C, Chan J (2005). Microtubules and the shape of plants to come. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(1):13-22.
- Lucas JR, Courtney S, Hassfurder M, Dhingra S, Bryant A, Shaw SL (2011). Microtubule-associated proteins MAP65-1 and MAP65-2 positively regulate axial cell growth in etiolated Arabidopsis hypocotyls. *Plant Cell.* 23(5):1889-903.
- Mandelkow EM, Mandelkow E, Milligan RA (1991). Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study. *J Cell Biol.* 114(5):977-91.
- Mao G, Chan J, Calder G, Doonan JH, Lloyd CW (2005). Modulated targeting of GFP-AtMAP65-1 to central spindle microtubules during division. *Plant J.* 43(4):469-78.
- Mao T, Jin L, Li H, Liu B, Yuan M (2005). Two microtubule-associated proteins of the Arabidopsis MAP65 family function differently on microtubules. *Plant Physiol.* 138(2):654-62.
- Marc J, Sharkey DE, Durso NA, Zhang M, Cyr RJ (1996). Isolation of a 90-kD Microtubule-Associated Protein from Tobacco Membranes. *Plant Cell.* 8(11):2127-2138.
- Margolis RL, Wilson L (1981). Microtubule treadmills--possible molecular machinery. *Nature.* 293(5835):705-11.
- Margolis RL, Wilson L (1998). Microtubule treadmilling: what goes around comes around. *Bioessays.* 20(10):830-6.
- Markus SM, Kalutkiewicz KA, Lee WL (2012). Astral microtubule asymmetry provides

- directional cues for spindle positioning in budding yeast. *Exp Cell Res.* 318(12):1400-6.
- Matuliene J, Essner R, Ryu J, Hamaguchi Y, Baas PW, Haraguchi T, Hiraoka Y, Kuriyama R (1999). Function of a minus-end-directed kinesin-like motor protein in mammalian cells. *J Cell Sci.* 112 (Pt 22):4041-50.
- Matthies HJ, McDonald HB, Goldstein LS, Theurkauf WE (1996). Anastral meiotic spindle morphogenesis: role of the non-claret disjunctional kinesin-like protein. *J Cell Biol.* 134(2):455-64.
- McKim KS, Hawley RS (1995). Chromosomal control of meiotic cell division. *Science.* 270(5242):1595-601.
- Meads T, Schroer TA (1995). Polarity and nucleation of microtubules in polarized epithelial cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 32(4):273-88.
- Mickey B, Howard J (1995). Rigidity of microtubules is increased by stabilizing agents. *J Cell Biol.* 130(4):909-17.
- Mimori-Kiyosue Y (2011). Shaping microtubules into diverse patterns: molecular connections for setting up both ends. *Cytoskeleton.* 68(11):603-18.
- Mineyuki Y (1999). The prepophase band of microtubules : its function as a cytokinetic apparatus in higher plants. *Int Rev of Cyto.* 187 :1-49
- Mitchison TJ (1993). Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science.* 261(5124):1044-7.
- Mitchison T, Kirschner M (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature.* 312(5991):237-42.
- Mitchison TJ, Kirschner MW (1995). Properties of the kinetochore *in vitro*. II. Microtubule capture and ATP-dependent translocation. *J Cell Biol.* 101(3):766-77.
- Mitra A, Sept D (2008). Taxol allosterically alters the dynamics of the tubulin dimer and increases the flexibility of microtubules. *Biophys J.* 95(7):3252-8.
- Mollinari C, Kleman JP, Jiang W, Schoehn G, Hunter T, Margolis RL (2002). PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone. *J Cell Biol.* 157(7):1175-86.
- Mountain V, Simerly C, Howard L, Ando A, Schatten G, Compton DA (1999). The kinesin-related protein, HSET, opposes the activity of Eg5 and cross-links microtubules in the mammalian mitotic spindle. *J Cell Biol.* 147(2):351-66.
- Murata T, Sonobe S, Baskin TI, Hyodo S, Hasezawa S, Nagata T, Horio T, Hasebe M (2005). Microtubule-dependent microtubule nucleation based on recruitment of gamma-tubulin in higher plants. *Nat Cell Biol.* 7(10):961-8.
- Musch A (2004). Microtubule organization and function in epithelial cells. *Traffic.* 5(1):1-9.

- Nakamura M, Ehrhardt DW, Hashimoto T (2010). Microtubule and katanin-dependent dynamics of microtubule nucleation complexes in the acentrosomal Arabidopsis cortical array. *Nat Cell Biol.* 12(11):1064-70.
- Narasimhulu SB, Reddy AS (1998). Characterization of microtubule binding domains in the Arabidopsis kinesin-like calmodulin binding protein. *Plant Cell.* 10(6):957-65.
- Nishihama R, Machida Y (2001). Expansion of the phragmoplast during plant cytokinesis: a MAPK pathway may MAP it out. *Curr Opin Plant Biol.* 4(6):507-12.
- Nogales E (2001). Structural insight into microtubule function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 30:397-420.
- Nogales E, Wolf SG, Downing KH (1998). Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature.* 391(6663):199-203.
- Nogales E, Wolf SG, Khan IA, Ludueña RF, Downing KH (1995). Structure of tubulin at 6.5 Å and location of the taxol-binding site. *Nature.* 375(6530):424-7.
- Nogales E, Wang HW, Niederstrasser H (2003). Tubulin rings: which way do they curve? *Curr Opin Struct Biol.* 13(2):256-61.
- Oegema K, Wiese C, Martin OC, Milligan RA, Iwamatsu A, Mitchison TJ, Zheng Y (1999). Characterization of two related Drosophila gamma-tubulin complexes that differ in their ability to nucleate microtubules. *J Cell Biol.* 144(4):721-33.
- Odde DJ, Ma L, Briggs AH, DeMarco A, Kirschner MW (1999). Microtubule bending and breaking in living fibroblast cells. *J Cell Sci.* 112 (Pt 19):3283-8.
- Pampaloni F, Lattanzi G, Jonás A, Surrey T, Frey E, Florin EL (2006). Thermal fluctuations of grafted microtubules provide evidence of a length-dependent persistence length. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(27):10248-53.
- Pastuglia M, Bouchez D (2007). Molecular encounters at microtubule ends in the plant cell cortex. *Curr Opin Plant Biol.* 10(6):557-63.
- Pellman D, Bagget M, Tu YH, Fink GR, Tu H (1995). Two microtubule-associated proteins required for anaphase spindle movement in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 130(6):1373-85.
- Pepperkok R, Bré MH, Davoust J, Kreis TE (1990). Microtubules are stabilized in confluent epithelial cells but not in fibroblasts. *J Cell Biol.* 111(6 Pt 2):3003-12.
- Peterman EJ, Scholey JM (2009). Mitotic microtubule crosslinkers: insights from mechanistic studies. *Curr Biol.* 19(23):R1089-94.
- Pfaendtner J, De La Cruz EM, Voth GA (2010). Actin filament remodeling by actin depolymerization factor/cofilin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(16):7299-304.
- Pizon V, Gerbal F, Diaz CC, Karsenti E (2005). Microtubule-dependent transport and organization of sarcomeric myosin during skeletal muscle differentiation. *EMBO J.* 24(21):3781-92.

- Popov AV, Severin F, Karsenti E (2002). XMAP215 is required for the microtubule-nucleating activity of centrosomes. *Curr Biol.* 12(15):1326-30.
- Ravelli RB, Gigant B, Curmi PA, Jourdain I, Lachkar S, Sobel A, Knossow M (2004). Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature.* 428(6979):198-202.
- Reilein A, Yamada S, Nelson WJ (2005). Self-organization of an acentrosomal microtubule network at the basal cortex of polarized epithelial cells. *J Cell Biol.* 171(5):845-55.
- Reymann AC, Martiel JL, Cambier T, Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R, Théry M (2010). Nucleation geometry governs ordered actin networks structures. *Nat Mater.* 9(10):827-32.
- Rodriguez-Boulán E, Kreitzer G, Müsch A (2005). Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(3):233-47.
- Rolls MM, Satoh D, Clyne PJ, Henner AL, Uemura T, Doe CQ (2007). Polarity and intracellular compartmentalization of *Drosophila* neurons. *Neural Dev.* 2:7.
- Roque H, Ward JJ, Murrells L, Brunner D, Antony C (2010). The fission yeast XMAP215 homolog Dis1p is involved in microtubule bundle organization. *PLoS One.* 5(12):e14201.
- Samsonov A, Yu JZ, Rasenick M, Popov SV (2004). Tau interaction with microtubules *in vivo*. *J Cell Sci.* 117(Pt 25):6129-41.
- Sandoval IV, Vandekerckhove JS (1981). A comparative study of the *in vitro* polymerization of tubulin in the presence of the microtubule-associated proteins MAP2 and tau. *J Biol Chem.* 256(16):8795-800.
- Sasabe M, Machida Y (2006). MAP65: a bridge linking a MAP kinase to microtubule turnover. *Curr Opin Plant Biol.* 9(6):563-70.
- Schulze E, Kirschner M (1988). New features of microtubule behaviour observed *in vivo*. *Nature.* 334(6180):356-9.
- Schuyler SC, Pellman D (2001). Search, capture and signal: games microtubules and centrosomes play. *J Cell Sci.* 114(Pt 2):247-55.
- Schuyler SC, Liu JY, Pellman D (2003). The molecular function of Ase1p: evidence for a MAP-dependent midzone-specific spindle matrix. *Microtubule-associated proteins. J Cell Biol.* 160(4):517-28.
- Shang Cai, Lesley N. Weaver, Stephanie C. Ems-McClung, and Claire E. Walczak (2009). Kinesin-14 Family Proteins HSET/XCTK2 Control Spindle Length by Cross-Linking and Sliding Microtubules. *Molecular Biology of the Cell Vol. 20, 1348–1359.*
- Sharp DJ, Yu KR, Sisson JC, Sullivan W, Scholey JM (1999). Antagonistic microtubule-sliding motors position mitotic centrosomes in *Drosophila* early embryos. *Nat Cell Biol.* 1(1):51-4.

- Shaw SL, Kamyar R, Ehrhardt DW (2003). Sustained microtubule treadmilling in Arabidopsis cortical arrays. *Science*. 300(5626):1715-8.
- Skowronek KJ, Kocik E, Kasprzak AA (2007). Subunits interactions in kinesin motors. *Eur J Cell Biol*. 2007 Sep;86(9):559-68.
- Smertenko AP, Chang HY, Wagner V, Kaloriti D, Fenyk S, Sonobe S, Lloyd C, Hauser MT, Hussey PJ (2004). The Arabidopsis microtubule-associated protein AtMAP65-1: molecular analysis of its microtubule bundling activity. *Plant Cell*. 16(8):2035-47.
- Smertenko AP, Kaloriti D, Chang HY, Fiserova J, Opatrny Z, Hussey PJ (2008). The C-terminal variable region specifies the dynamic properties of Arabidopsis microtubule-associated protein MAP65 isotypes. *Plant Cell*. 20(12):3346-58.
- Subramanian R, Wilson-Kubalek EM, Arthur CP, Bick MJ, Campbell EA, Darst SA, Milligan RA, Kapoor TM (2010). Insights into antiparallel microtubule crosslinking by PRC1, a conserved nonmotor microtubule binding protein. *Cell*. 142(3):433-43.
- Stepanova T, Slemmer J, Hoogenraad CC, Lansbergen G, Dortland B, De Zeeuw CI, Grosveld F, van Cappellen G, Akhmanova A, Galjart N (2003). Visualization of microtubule growth in cultured neurons via the use of EB3-GFP (end-binding protein 3-green fluorescent protein). *J Neurosci*. 23(7):2655-64.
- Stiess M, Maghelli N, Kapitein LC, Gomis-Rüth S, Wilsch-Bräuninger M, Hoogenraad CC, Tolić-Nørrelykke IM, Bradke F (2010). Axon extension occurs independently of centrosomal microtubule nucleation. *Science*. 327(5966):704-7.
- Stone MC, Roegiers F, Rolls MM (2008). Microtubules have opposite orientation in axons and dendrites of Drosophila neurons. *Mol Biol Cell*. 19(10):4122-9.
- Stoppin V, Vantard M, Schmit AC, Lambert AM (1994). Isolated Plant Nuclei Nucleate Microtubule Assembly: The Nuclear Surface in Higher Plants Has Centrosome-like Activity. *Plant Cell*. 6(8):1099-1106.
- Tao W, Walter RJ, Berns MW (1988). Laser-transected microtubules exhibit individuality of regrowth, however most free new ends of the microtubules are stable. *J Cell Biol*. 107(3):1025-35.
- Tassin AM, Maro B, Bornens M (1985). Fate of microtubule-organizing centers during myogenesis *in vitro*. *J Cell Biol*. 100(1):35-46.
- Tilney LG, Bryan J, Bush DJ, Fujiwara K, Mooseker MS, Murphy DB, Snyder DH (1973). Microtubules: evidence for 13 protofilaments. *J Cell Biol*. 59(2 Pt 1):267-75.
- Troxell CL, Sweezy MA, West RR, Reed KD, Carson BD, Pidoux AL, Cande WZ, McIntosh JR (2001). *pk11(+)* and *klp2(+)*: Two kinesins of the Kar3 subfamily in fission yeast perform different functions in both mitosis and meiosis. *Mol Biol Cell*. 12(11):3476-88.
- Tulin A, McClerklin S, Huang Y, Dixit R (2012). Single-molecule analysis of the microtubule

- cross-linking protein MAP65-1 reveals a molecular mechanism for contact-angle-dependent microtubule bundling. *Biophys J.* 2012 Feb 22;102(4):802-9.
- Vale RD, Coppin CM, Malik F, Kull FJ, Milligan RA (1994). Tubulin GTP hydrolysis influences the structure, mechanical properties, and kinesin-driven transport of microtubules. *J Biol Chem.* 269(38):23769-75.
- Valiron O, Arnal I, Caudron N, Job D (2010). GDP-tubulin incorporation into growing microtubules modulates polymer stability. *J Biol Chem.* 285(23):17507-13.
- Van Damme D, Van Poucke K, Boutant E, Ritzenthaler C, Inzé D, Geelen D (2004). *In vivo* dynamics and differential microtubule-binding activities of MAP65 proteins. *Plant Physiol.* 136(4):3956-67.
- VanBuren V, Cassimeris L, Odde DJ (2005). Mechanochemical model of microtubule structure and self-assembly kinetics. *Biophys J.* 89(5):2911-26.
- Venier P, Maggs AC, Carlier MF, Pantaloni D (1994). Analysis of microtubule rigidity using hydrodynamic flow and thermal fluctuations. *J Biol Chem.* 269(18):13353-60.
- Verbrugghe KJ, White JG (2004). SPD-1 is required for the formation of the spindle midzone but is not essential for the completion of cytokinesis in *C. elegans* embryos. *Curr Biol.* 14(19):1755-60.
- Verni F, Somma MP, Gunsalus KC, Bonaccorsi S, Belloni G, Goldberg ML, Gatti M (2004). Feo, the *Drosophila* homolog of PRC1, is required for central-spindle formation and cytokinesis. *Curr Biol.* 14(17):1569-75.
- Vinh DB, Kern JW, Hancock WO, Howard J, Davis TN (2002). Reconstitution and characterization of budding yeast gamma-tubulin complex. *Mol Biol Cell.* 13(4):1144-57.
- Wade RH, Hyman AA (1997). Microtubule structure and dynamics. *Curr Opin Cell Biol.* 9(1):12-7.
- Wakida NM, Botvinick EL, Lin J, Berns MW (2010). An intact centrosome is required for the maintenance of polarization during directional cell migration. *PLoS One.* 5(12):e15462.
- Walker RA, Inoué S, Salmon ED (1989). Asymmetric behavior of severed microtubule ends after ultraviolet-microbeam irradiation of individual microtubules *in vitro*. *J Cell Biol.* 108(3):931-7.
- Walker RA, O'Brien ET, Pryer NK, Soboeiro MF, Voter WA, Erickson HP, Salmon ED (1988). Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J Cell Biol.* 107(4):1437-48.
- Walczak CE, Verma S, Mitchison TJ (1997). XCTK2: a kinesin-related protein that promotes mitotic spindle assembly in *Xenopus laevis* egg extracts. *J Cell Biol.* 136(4):859-70.
- Wang L, Brown A (2002). Rapid movement of microtubules in axons. *Curr Biol.* 12(17):1496-1501.

- Waters JC, Salmon E (1997). Pathways of spindle assembly. *Curr Opin Cell Biol.* 9(1):37-43.
- Wasteneys GO (2002). Microtubule organization in the green kingdom: chaos or self-order? *J Cell Sci.* 115(Pt 7):1345-54.
- Wasteneys GO, Ambrose JC (2009). Spatial organization of plant cortical microtubules: close encounters of the 2D kind. *Trends Cell Biol.* 19(2):62-71.
- Watts NR, Cheng N, West W, Steven AC, Sackett DL (2002). The cryptophycin-tubulin ring structure indicates two points of curvature in the tubulin dimer. *Biochemistry.* 41(42):12662-9.
- Wicker-Planquart C, Stoppin-Mellet V, Blanchoin L, Vantard M (2004). Interactions of tobacco microtubule-associated protein MAP65-1b with microtubules. *Plant J.* 39(1):126-34.
- Wightman R, Turner SR (2007). Severing at sites of microtubule crossover contributes to microtubule alignment in cortical arrays. *Plant J.* 52(4):742-51.
- Yamashita A, Sato M, Fujita A, Yamamoto M, Toda T (2005). The roles of fission yeast *ase1* in mitotic cell division, meiotic nuclear oscillation, and cytokinesis checkpoint signaling. *Mol Biol Cell.* 16(3):1378-95.
- Yu W, Cook C, Sauter C, Kuriyama R, Kaplan PL, Baas PW (2000). Depletion of a microtubule-associated motor protein induces the loss of dendritic identity. *J Neurosci.* 20(15):5782-91.
- Zheng Y, Wong ML, Alberts B, Mitchison T (1995). Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature.* 378(6557):578-83.
- Zhu C, Lau E, Schwarzenbacher R, Bossy-Wetzels E, Jiang W (2006). Spatiotemporal control of spindle midzone formation by PRC1 in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(16):6196-201.

Annexe

MAP65 coordinate microtubule growth during bundle formation

Virginie Stoppin-Mellet[†], Vincent Fache, Didier Portran, Jean-Louis Martiel, Marilyn Vantard[†]

Laboratoire de Physiologie Cellulaire & Végétale, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant (iRTSV), Centre National de la Recherche Scientifique/Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives/Institut National de la Recherche Agronomique/Université Joseph Fourier (CNRS/CEA/INRA/UJF), Grenoble F-38054, France

[†] Address correspondence to: Virginie Stoppin-Mellet (virginie.stoppin-mellet@cea.fr) or Marilyn Vantard (marylin.vantard@cea.fr).

Tel: (33) 438 783 203; Fax: (33) 438 785 091

Running head: Dynamics of MAP65-bundled MTs

Abbreviations: MT, Microtubule; MAP65, Microtubule-Associated Protein 65; GFP, Green Fluorescent Protein; TIRFm, Total Internal Reflection Fluorescence microscopy

ABSTRACT

Microtubules (MTs) are highly dynamical structures that play a crucial role in cell physiology. In cooperation with microtubule-associated proteins (MAPs), MTs form bundles endowing cells with specific mechanisms to control their shape or generate forces. Whether the dynamics of MTs is affected by the lateral connections that MAPs make between MTs during bundle formation is still under debate. Using *in vitro* reconstitution of MT bundling, we analyzed the dynamics of MT bundles generated by two plant MAP65 (MAP65-1/4), MAP65-1 being the plant ortholog of vertebrate PRC1 and yeast Ase1. MAP65-1/4 modify MT dynamic parameters mainly by limiting MT depolymerization and increasing MT rescue frequencies. The subsequent sustained elongation of bundles is governed by the coordination of MT growth, so that MT ends come in close vicinity. We develop a model based on the assumption that both MAP65-1/4 block MT depolymerization. Model simulations reveal that rescue frequencies are higher between parallel than between anti-parallel MTs. In consequence the polarity of bundled MTs by MAP65 controls the amplitude of bundle's growth. Our results illustrate how MAP-induced MT-bundling, which is finely tuned by MT polarity, robustly coordinates MT elongation within bundles.

INTRODUCTION

Microtubules (MTs) are dynamic polar polymers assembled from tubulin heterodimers and alternating polymerization and depolymerization phases at their ends [1]. MT catastrophes (switch from growth to shrinkage) or rescues (reverse switch from pause or shrinkage to growth) events have received much attention *in vivo* [2], [3], *in vitro* [4] and in theoretical studies [5]. These sudden transitions of MT dynamics, named dynamic instability, coordinate many aspects of cellular processes crucial to the establishment of cell polarity, cell morphogenesis or cell division. Powering these cellular functions often hinges on the ability of MTs to self-organize into highly ordered structures. This is true for most differentiated animal cell types that contain large numbers of MT arrays in non-centrosomal assembly (e.g. neuronal cells, polarized epithelial cells), in most fungi and in acentrosomal plant cells [6]. In these eukaryote cells, many MT arrays are composed of bundles. Although these MTs are cross-linked, they stay dynamic inside bundles [7]. How the dynamic behavior of the MTs and their polarity within the bundles affect the steady-state of these MT networks and their self-organization into highly ordered arrays remains an important question in cell biology.

MT bundles are built through the activity of cross-linking proteins, including motor and/or non-motor microtubule-associated proteins (MAPs), among them the members of the non-motor MAP65 family. These MAP65 are major MT cross-linkers in vertebrate (PRC1, [8]), fungi (Ase1, [9]) and plant cells (MAP65-1 to MAP65-9, [10]). *In vivo*, MAP65 proteins are required for the maintenance of the mitotic spindle bipolarity during midzone formation in anaphase and for cytokinesis [11], [12], [13], [14]. Ase1 also mediates the bundling of interphase MTs [13]. In plant, with the exception of MAP65-3, direct evidence for specific roles of the different MAP65 in MT bundling *in vivo* are still missing. Nevertheless, all plant MAP65 studied so far are associated with MT bundles *in vivo*, but their cellular localizations vary. For example, MAP65-1 associates with cortical MTs, the pre-prophase band and the spindle midzone [15], [16], whereas MAP65-4 is associated with the forming spindle (prophase) and the kinetochore fibers (prophase to anaphase; [17]). *In vitro*, all these MAP65 share the common ability to bundle MTs, but they differ by their physical interactions with the MT lattice and/or by the cross-links they form between adjacent MTs. Indeed, *in vitro*, MAP65-1 and PRC1 cross-link anti-parallel MTs with an inter-MT

spacing of 30 nm. In addition, the cross-links between MTs are diagonally oriented with an angle of $\sim 60^\circ$ relative to the MT lattice [18], [19]. In marked contrast, MAP65-4 links both parallel and anti-parallel MTs by forming perpendicular cross-bridges of 15 nm wide [17]. Ase1 forms cross-links of 6 nm mostly between anti-parallel MTs [9], [20] but the structure of the cross-bridges between MTs has not yet been determined. Thus the specific physico-chemical properties of MAP65-1/4 isoforms might allow the formation of bundles with different *in vitro* dynamics that would explain their specific distribution and function *in vivo*.

Up to now, little is known about the dynamic of MTs inside bundles. One of the reasons for this lack of data is that the analysis of the dynamics of bundled MTs in living cells is difficult due to the high MT density within bundles such as in the plant cell cortex or in the mitotic spindle. In consequence, the tracking of MT dynamics inside a bundle is often difficult. For example, the effects of neuronal MT bundlers tau and MAP2 on dynamics of cross-linked MTs are poorly known, although they have been extensively studied on single MTs [21]. As well, several studies showed that PRC1, Ase1 and MAP65-4 do not affect MT growth and shrinkage velocities of bundled MTs [13], [17], [20], [22]. Furthermore, bundled MTs associated with MAP65-1 in plant living cells have comparable growth and shortening velocities than unbundled MTs [23]. Whether other parameters of MT dynamics are modulated upon bundling remains to be investigated. Although, some experimental evidences suggest that MAP65-4 limits catastrophe events of bundled MTs *in vitro* [17]. Finally, it is not known if the global dynamic of MT bundles generated by various MAPs results from intrinsic MT polymerization activity and/or from MT-MT coupling inside the bundle. In particular, whether MAP-driven MT orientation (parallel versus anti-parallel orientation) and MT organization (distance between adjacent MTs, stability of the cross-links) within bundles affect MT bundle growth is still unclear.

In the present study, we asked whether MT bundling affects the dynamics of MT inside bundles, and whether MT orientation controls the growth of the whole bundle. To address these questions, we focused on MAP65-1 and MAP65-4 as both proteins differ by their selectivity for parallel and anti-parallel MTs and by the geometry of the inter-MT links they form. We set up a biomimetic assay that reproduces the assembly of bundles made of numerous MTs to mimic *in vivo* MT bundles. We found that both MAP65-1/4 drive bundled MT dynamics into an unlimited growth regime by reducing MT catastrophe and increasing MT rescue

events without affecting MT growth and shortening rates. We then developed a model to correlate the MT polarity and the dynamic properties of individual MTs in MAP65 induced bundles with the observed bundle growth *in vitro*. Our experimental data and simulations show that bundled MTs adopt a collective behavior resulting from coordinated MT growth. In addition, we found that the polarity of MTs linked by MAP65 finely tunes the growth rate of bundles.

MATERIAL AND METHODS

Preparation of proteins

Tubulin was purified from bovine brain according to [24] and assembled in BRB buffer (80 mM PIPES, pH 6.8, 1 mM EGTA, and 1 mM MgCl₂ plus 1 mM GTP). Fluorescent tubulin (Alexa 488-labelled tubulin and Alexa 568-labelled tubulin) and biotinylated tubulin were prepared according to [25]. Recombinant *Arabidopsis thaliana* MAP65-1 and MAP65-4 were purified as tagged proteins with a His tag at the N and C termini, or GFP at the N terminus and His tag at the C terminus as described by [18]. They were purified on Ni Sepharose columns and stored at -80°C in 10% (v/v) glycerol, 50 mM NaPi, 0.1 M NaCl, and 0.5 mM DTT, pH 7.9.

Total Internal Reflection Fluorescence microscopy assays

Assays were done according to [17]. Briefly, assays were performed either in 5 μ l final volume between a slide and a coverslip, or in a perfusion chamber (15 μ l). Glass was cleaned with rounds of ethanol/water washes, and further silanized using dichloromethylsilan to limit interactions between MTs and the cover glass. GMPCPP-stabilized short MTs were assembled from 10 μ M tubulin (3 μ M Alexa 568-labelled tubulin, 7 μ M biotinylated tubulin) with 0.5 mM GMPCPP in BRB buffer, for 2 hours at 37 °C. These short MTs (0.3 μ M) were incubated with MAP65-1 (0.1 μ M MAP65-1/4) for 10 min at room temperature to generate MT seed bundles. They were then laid on neutravidin-coated slides for 10 min. After two washes with BRB-1%BSA, MT seed bundles were incubated with an elongation mix containing tubulin (17 μ M of unlabeled tubulin, 5 μ M of Alexa-labeled tubulin), MAP65-1/4 (from 0.1 μ M to 1.5 μ M), 1 mM GTP, an anti-fading cocktail (2 mg/mL glucose, 80 μ g/mL catalase, and 0.67 mg/mL glucose oxydase), and 1.5% BSA (Figure 1A). MT assembly was visualized using an objective-based TIRF microscope (Nikon TE2000-E) and

Quantem 512SC camera (Photometrics). Microscope stage was kept warm (32°C) using a warm stage controller (LINKAM MC60). Excitation was achieved using 491 nm and 561 nm lasers (Optical Insights). Time-lapse microscopy (one frame every 2 s) was performed for 30 min using Metamorph software (Universal Imaging).

MT nucleation from axonemes

Sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) axonemes spotted on a coverslip were first mixed for 5 min with 10 μ M tubulin at 35°C to initiate MT nucleation and elongation, and then perfused with various concentrations of MAP65-1. MT elongation was recorded on TIRFm as before.

Analysis of the MT bundle dynamics with kymographs

Time-lapse movies were treated with filters (equalize light, low pass and flatten background of Metamorph software) to improve signal/noise ratio. Kymographs of the MTs were generated using Metamorph and analyzed with ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2008). Elongation/shortening rates correspond to the slope of elongating/shrinking MTs inside the bundles respectively. (+) and (-) MT ends were easily identified on kymographs of single MTs and of bundles containing a low number of MTs (2-3). (+/-) MT ends correspond to fast/slow growing ends (high/low slopes on the kymographs). In complex kymographs that correspond to bundles containing numerous MTs, the traces of individual MTs cannot be follow over long period. For such bundles, rates of MTs were calculated without assigning a specific polarity to the MTs. We considered that the bimodal distribution of rates correspond to (+) and (-) ends, in respect to the bimodal distribution of single MTs (Figure 2C-D, Figure S1A-B; Figure S2B-C; Figure S3C-D).

Measurements of the dynamics of MT bundles (duration of elongation, shrinking and elongation length) were extracted from the life history plots of the corresponding kymographs (see examples in Figure 1E and S2D). Traces correspond to the longest MT of the bundle, thus illustrating the dynamic of the whole bundle. Duration of elongation corresponds to the time between rescue and catastrophe events. Length of elongation corresponds to the distance on which MTs/bundles grow between rescue and catastrophe events. Length of depolymerization corresponds to the distance on which MTs/bundles shrink between catastrophe and rescue events.

Catastrophe frequency corresponds to the number of catastrophe events divided by the time MTs/bundles elongate and pause. Rescue frequency corresponds to the number of rescue events divided by the time MTs/bundles depolymerize. The length of a bundle corresponds to the length of the longest MT of the bundle. The statistical significance was determined using Student's *t* test and non-parametric Kruskal-Wallis test.

Modeling of MT bundle growth in the presence of MAP65-1 and MAP65-4.

We first simulated the kinetics of unbundled MTs, including polymerization/depolymerization rates and rescue/catastrophe frequencies to account for the dynamics of MT alone. Then we considered that MAP65 establish bonds between pairs of parallel and/or anti-parallel MTs, thereby modifying the MT bundle growth. Different models for the interactions between either MAP65-1 or MAP65-4 and MT orientation within bundles (parallel or anti-parallel) were studied to account for the average bundle growth observed in TIRF microscopy. See the supplementary material section and Figures S6 and S7 for a detailed description of the model.

RESULTS

Dynamics of MTs in MAP65-1/4 induced bundles

The main question we asked in this study is whether dynamics of MTs are modified by lateral MAP65 links between MTs as it occurs in bundles. To answer this question, we analyzed the dynamics of MAP65-1 induced bundles. We used an *in vitro* system to generate bundles of growing MTs (up to 7 MTs) (Figure 1A). First, short stable MTs were bundled by MAP65 in order to generate short stable bundles that were further attached to a coverslip via biotin/neutravidin interactions. In a second step, these short bundles served as seeds to elongate MTs in the presence of tubulin (22 μ M) and various MAP65 concentrations. MT bundles formation was imaged in real time using a two-color Total Internal Reflection Fluorescence microscope (TIRFm). This *in vitro* reconstitution of MT bundles allows the study of their dynamics as units with their own characteristics.

In the assays, knowing that apparent K_d of MAP65-1 for MTs is 0.57 μ M ([26]; 1.03 μ M as determined in [27]), we used MAP65-1 concentrations ranging from 0.1 μ M to 1.5 μ M. In the presence of MAP65-1, we observed that MT bundle length increased

linearly with time and generated a dense array of MT bundles (Figure 1B, Movies S1 and S2). MAP65-1 accumulates on growing bundled MTs concomitantly with the elongation of MT bundles (Figure 1C). To identify what changes are responsible for this increased assembly, we generated kymographs of bundles (length/time plots; Figure 1D). In agreement with previous observations [18], kymographs revealed a mixed MT polarity in the bundles, confirming that MAP65-1 binds anti-parallel MTs. Length history plots of MT bundles (Figure 1E) show that MT assembly increases with MAP65-1 concentrations. We used the kymographs to measure the parameters of MT dynamics inside bundles. MT elongation and shortening rates were calculated from the slopes of MT traces (see the right kymograph in Figure 1D for example). We observed that growth and shortening rates of MTs cross-linked by MAP65-1 were similar to those determined for single MTs (Figure S1A and S1B). This suggests that the increased growth of bundled MTs is due to changes in their catastrophe and/or rescue frequencies in comparison with single MTs. To measure these frequencies, we considered as rescue events i) regrowth from a depolymerizing MT and ii) growth from the seeds. Note that slowly growing MTs such as MT (-) ends were embedded in the center of bundles and were hardly detectable in kymographs (Figure 1D). Therefore it is probable that MT (-) ends are underrepresented in our analysis. We found that rescue frequencies of bundled MT increased with MAP65-1 concentrations, whereas catastrophe frequencies remained constant (Figure 1F and 1G).

In agreement with these results, we observed that the elongation duration of bundled MTs, measured as the time interval between a rescue and a catastrophe event, increased as a function of MAP65-1 concentration (Figure 1H). This MT elongation, is 2.7 min on average in the absence of MAP65-1, but jumps to an average of 6.2 min in presence of 1 μ M MAP65-1. Conversely, MAP65-1 bundling reduced the amplitude of MT depolymerization (Figure 1I). Indeed, in the absence of MAP65-1, half of the MTs depolymerized for at least 5 μ m, whereas in the presence of 1.0 μ M MAP65-1 half of the bundled MTs depolymerized over 2 μ m. This is easily seen in the length history plots of MTs were single MTs depolymerized up to the seed (Figure 1E, left graph), whereas shrinking bundled MTs experienced a rescue before they reach the seed (Figure 1E, three right graphs). Both, the increase of the elongation duration of bundled MTs and the reduction of the distance over which they depolymerize correlate with the age of the MTs. Indeed MT elongation increases over the whole

period (Figure S1C) and the mean depolymerization length decreases with time in the presence of MAP65-1 (Figure S1D). We conclude that MAP65-1 bundles are characterized by long elongation periods and short depolymerization phases, in correlation with increased rescue frequencies. This new dynamical regime amplified with time, such that depolymerization length becomes shorter and shorter as the bundle ages.

We asked whether the new dynamical regime we observed also applies to bundles with a low number of MTs. Since our experimental set-up disfavor the formation of small bundles, we could not collect enough data for reliable statistical analysis. However our measurements indicate no significant correlation between the number of MTs and the bundle growth rate.

The sustained growth of MT bundles was not specific to MAP65-1 induced bundles, as we observed that MAP65-4 bundled MTs have similar dynamics as those bundled by MAP65-1 (Figure S2; movie S3; [17]). Mainly MT elongation/shortening rates are not affected (Figure S2 A-C) and elongation/shortening amplitudes increased/decreased respectively (Figure S2 D-H).

Dynamics of single MTs in the presence of MAP65-1

We then asked if the persistent growth of bundled MTs was either due to (i) the binding of MAP65 on the MT, or due to (ii) the MAP65 links between adjacent MTs. To answer this question, we compared the dynamics of single MTs in the absence of MAP65-1 (naked MTs) with the one of single MTs saturated with MAP65-1. Indeed we assumed that single MTs saturated with MAP65-1 are very similar to bundled MTs whose surface is covered with MAP65-1 that cross-link them. In our experimental set-up, saturation of single MTs assembled from 22 μM tubulin was obtained with 0.1 μM MAP65-1. When single MTs were polymerized with higher MAP65-1 concentrations, elongation of MTs was impaired and protein aggregation occurred. At the concentration of 0.1 μM MAP65-1, we observed that MAP65-1 binds along MTs (Figure 2A), and that length history plots of single MAP65-1 saturated MTs were similar to those of naked MTs (Figure 2B). Analysis of the dynamics of single naked MTs and single MAP65-1 saturated MTs reveals no difference (i) in MT shortening rates (Figure 2D), (ii) in the duration of MT elongation (Figure 2E), and (iii) in the MT depolymerization amplitude (Figure 2F and 2G). MT elongation rates were slightly reduced in the presence of 0.1 μM MAP65-1 (Figure 2C), also this was not

observed in the presence of 50 nM MAP65-1 (Figure S3). In correlation with these results, there was no statistical difference between the frequencies of rescue and catastrophe events of naked MTs and MTs assembled in the presence of 0.1 μ M MAP65-1 (Table 1). Thus we conclude that MAP65-1 does not affect significantly the dynamics of unbundled MTs.

Modeling MT bundle dynamics

Our *in vitro* experimental setup gave only a macroscopic view of the growth of MT bundles. To fully understand the mechanisms that drive the sustained growth of bundled MTs, we should follow individual MTs dynamics inside bundles. In this attempt we set up a microscopic kinetic model in which we could quantify the dynamic parameters of bundled MTs, count the number of MTs in the bundles and correlate their dynamics with MAP65 properties.

In a first step, we simulated the dynamics of MTs that elongate from individual stable seeds using the dynamic parameters extracted from kymographs corresponding to individual MTs observed *in vitro* (Table 2; Figure 3A-C; Figure S4; movie S1). Results of the simulations are illustrated by kymographs of single MTs, as shown in Figure 3D-E and movie S4. Next, we simulated the assembly of MTs bundled by both MAP65-1 and MAP65-4. To account for the reduction of depolymerization length of bundled MTs observed *in vitro* (Figure 1I and Figure S2F; [17]), we hypothesized that the MAP65 bonds between MTs in a bundle act as a stop during MT shrinkage. When a MAP65-crosslinked MT undergoes depolymerisation, it shortens until the shrinking end reaches a MAP65. At this stage, either the MAP65 bond is removed, and MT depolymerization continues, or the MAP65 bond resists and MT depolymerization stops. The resistance of MAP65 bonds to depolymerization relies on multiple parameters such as the affinity of MAP65 for MT, the affinity between MAP65 dimers, the structural conformation of MAP65, or the density of MAP65 molecules on MTs. However, this study and available data from literature are not sufficient to test all these parameters independently. Thus we considered a lumped parameter to model the resistance of a MAP65 to MT depolymerization (Figure 4A). In the model, a MAP65 bond has a probability pR to be removed by a depolymerizing MT, and a probability $(1-pR)$ to resist MT depolymerization and stop it. In addition, we consider that MAP65 connecting anti-parallel or parallel MTs inside a bundle are removed with probabilities pR_{ap} and pR_p , respectively (Figure 4B). Thus in our model the amplitude of MT depolymerisation depends on the MAP65 sensitivity to MT

depolymerization (Figure 4C). On one hand, low pR_{ap} (or pR_p) (close to 0) limits the depolymerisation to short distances. On the other hand, with high pR_{ap} (or pR_p) (close to unity), MT-MT MAP65 bonds are easily removable and depolymerization extension is almost independent of the presence of MAP65. We simulated the MT dynamics in MT bundles for different values of pR_{ap} and pR_p , and for different numbers of MTs in the bundles. The accuracy of the model is evaluated by the difference between the expected maximal MT bundle length given by the model and the MT bundle length observed *in vitro* over a period of 20 minutes (Figure 5B, F and H). The distance between experiment and model is represented as a color map, and is explained in Figure S6. We estimated pR_{ap} (or pR_p) and the number of MTs in bundles as the parameter combination that minimizes this error for all tested MAP65 concentrations.

MT polarity control bundle growth

We first consider a simple situation in which the polarity of bundled MTs is not a discriminant parameter to control bundle growth. This should be the case for bundles that elongate in the presence of MAP65-4, as MAP65-4 randomly cross-links parallel and anti-parallel MTs [17]. In this situation, we impose that pR_{ap} and pR_p have the same value, pR . Our model was sufficient to generate MT bundle whose lengths were comparable to those observed experimentally for different MAP65-4 concentrations (Table 3). We determined that the combination of at least 6 MTs with a pR of 0.7 gave the best match between the model and the experiments (Figure 5B). If $pR < 0.7$, then the predicted MT length is larger than those measured *in vitro* (Figure 5A). Using these parameters ($pR=0.7$; 10 MTs), predicted kymographs of MT bundles are very similar to their experimental counterparts (Figure 5C-E; movie S5). Note that kymograph similarity is measured by the difference between measured and simulated bundle length (Figure S6). They clearly show that bundles have a sustained growth, and that depolymerization phases are short. Kymograph of bound MAP65-4, given in Figure 5E, illustrates the residence time of MAP65-4 on bundled MTs. This kymograph shows that MAP65-4 accumulates in the bundles as MTs elongate, although MAP65-4 bonds are labile. Altogether these data are in agreement with recent experimental data that indicated the non-selectivity for MT polarity of MAP65-4 [17].

We next ask how MT orientation inside bundles affects the growth of the bundles

induced by MAP65-1. Since previous studies have shown that MAP65-1 strongly selects anti-parallel MTs [18], we impose that pR_{ap} is independent from pR_p . In a first step, we assumed that MAP65-1 connects anti-parallel MTs only (i.e. pR_p is set to 0). Using this hypothesis, we observed that the maximal MT length in the bundle is systematically underestimated by the model (Table 4), resulting into a large error. Because MTs coupling comes in pairs, the growth of MT ends by MAP65-1 is limited by the growth rate of the slowest growing MT end of the pair, i.e. the minus end in anti-parallel MT pairs. Thus we relaxed the assumption that MAP65-1 forms anti-parallel MT pairs only, and we introduced the possibility that MAP65-1 makes bonds between parallel MTs (i.e. $pR_p \neq 0$, Figure 4A). To evaluate the respective effects of MAP65-1 links between parallel MTs versus anti-parallel MTs, we simulated the growth of bundles of 10 MTs for different combinations of pR_{ap} and pR_p . As before, we compared the maximal length of simulated bundles to the length of experimental MT bundles. Computed errors for all MAP65-1 concentrations revealed that the best fit was obtained for high pR_p (~ 0.8) and low pR_{ap} (~ 0.3) (Figure 5F). This result indicates that MAP65-1 bonds between parallel MTs are easily removed during MT depolymerization. It also suggests that although MAP65-1 bonds between parallel MTs are rather loose, they have a major effect on the length of the MT bundle. This makes sense as bonds between parallel MTs allow (+/+) MT ends connections that can readily elongate. If these bonds were absent or were too labile (pR_p close to 1), MT bundles would be shorter than those observed *in vitro* (Table 4; Figure 5F). If they were too stable (low pR_p), then MT bundles would be too long. In a second step, we varied the number of MTs and pR_p , and we calculated the length of MT bundles for a fixed pR_{ap} value chosen in the interval [0, 0.5]. Simulations were carried out for different MAP65-1 concentrations (0.1 μM ; 0.15 μM ; 0.5 μM) (Figure 5G; see also Figure S5A for a systematic evaluation of the bundle dynamics for different pR_{ap}). Best parameter fits were obtained for simulated bundles with more than 6 MTs and high pR_p (around 0.9) (Figure 5H), whatever the actual value of pR_{ap} or the concentration of MAP65-1. This confirms that MAP65-1 bonds between parallel MTs are labile (high pR_p); conversely, the error rapidly increases for low pR_p (Figure 5H) because the simulated MTs are too long compared to the experimental ones (Figure 5G). These data corroborate the hypothesis that bonds between parallel MTs have a strong effect on MT length. In bundles having more than 6 MTs, this property is independent of the sensitivity of MAP65-1 links between anti-parallel MTs (pR_p ;

Figure S5B), and of MAP65-1 concentration (Figure S5C). The predicted kymograph of MAP65-1 cross-linked MTs (Figure 5J, Movie S6) is similar to the experimental one (Figure 5I; Movie S3). This kymograph shows that leading MT (+) ends control the size of the bundle. Although MAP65-1 bonds can be easily removed, as indicated by the blue isolated segments (Figure 5K; movie S6), their effect is sufficient to protect parallel MTs from large depolymerization. Depolymerization of MT (+) ends is also blocked by MT (-) ends, as rescue events occurred in the vicinity of the MT (-) ends (Figure 5J).

To validate that MAP65-1 has the ability to bundle parallel MTs as required by the model, we nucleated MTs from axonemes, thus creating an array of close parallel MTs. In the absence of MAP65-1, nucleated MTs radially organize from the axonemes, whereas in the presence of MAP65-1, they form a thick bundle (Figure S5D). Thus MAP65-1 also binds parallel MTs *in vitro*. Furthermore, we performed FRAP experiments on MAP65-1 mediated bundles, containing either parallel and anti-parallel MTs, or parallel MTs only (axoneme-nucleated MTs bundled with MAP65-1). Mean half-time recovery of MAP65-1 on parallel MTs was 25.4 sec (from 3.8 sec to 61 sec; N=18), whereas it varies from 3.5 sec to 231 sec (N=29) on bundles of mixed MT polarity. The range of half-time recovery, especially for bundles of mixed MT polarity, may result from the variability in the number of MTs present in each bundle, as this parameter influences the diffusion of MAP65-1 molecules between MTs. Nevertheless this observation suggest that MAP65-1 cross-links between parallel MTs are labile. These observations are in agreement with a recent study showing that the dwell-time of MAP65-1 on parallel MTs is larger than its dwell-time on anti-parallel MTs [27]. Altogether these data demonstrate that in bundles, MAP65-1 binds to both parallel and anti-parallel MTs. But the MAP65-1 links between parallel MTs are more sensitive to MT depolymerization than those between anti-parallel MTs. The stability of MAP65-1 bonds between parallel and anti-parallel MTs control the length of MT bundles.

MT dynamics inside bundles

To get further insight in the dynamics of MTs in bundles, we computed the distribution of polymerization/depolymerization amplitude and the rescue/catastrophe frequencies in different conditions. We used the best-fit parameters obtained for MAP65-1 ($pR_{ap}=0.1$ and $pR_p=0.8$) and for MAP65-4 ($pR_{ap}=pR_p=0.7$). In addition, we

considered a hypothetical MAP, denoted MAP-X, with parameters $pR_{ap}=0.8$ and $pR_p=0.1$; note that MAP-X represents the “symmetric” of MAP65-1. Finally, we also simulated control conditions for which $pR_{ap}=pR_p=1$, *i.e.* the MAP has no effect on MT depolymerisation. Bundle growth was simulated for a period of 20 min with 10 MTs in the bundle. We used 20 independent model runs, yielding an average of 10,000 events for each distribution curve. We found that in the presence of MAP65-1, MAP65-4 or MAP-X, the polymerization amplitude of bundled MTs was enhanced for both (+) and (-) MT ends (Figure 6A, left column). In marked contrast, the depolymerization amplitude was greatly reduced for both ends (Figure 6A, right column). These results show that the 3 MAP we tested affect the dynamics of MTs in bundles. This is in agreement with the growth of a whole bundle as observed at the microscopic level *in vitro* assay (Figure 1 and Figure S2).

To characterize the growth regime of bundles, we plotted the distance between the longest (L_{max}) and the shortest MT (L_{min}) in a bundle during its elongation (Figures 6B and 6D). In control conditions, this distance ($L_{max}-L_{min}$) increased slowly before reaching a plateau ($\sim 8 \mu\text{m}$), approximately 10 min after the initial rise (Figure 6B, black curve). The existence of a plateau indicates a steady-state regime characterized by the exact balance between depolymerisation and polymerization. This is related to the distribution of polymerization and depolymerization lengths of MT (+) ends, that both peak at about the same value (Figure 6A, black curves, top row). In contrast, the presence of MAP bonds (from MAP65-1, MAP65-4 or MAP-X) yields to a sustained linear increase of the ($L_{max}-L_{min}$) distance (Figure 6B, color curves). This indicates that polymerization and depolymerisation are no more balanced inside the bundle. This observation is coherent with the distribution of polymerization and depolymerisation lengths, since their maxima occur, respectively, at $\sim 5 \mu\text{m}$ (polymerization, Figure 6A, top, left, color curves) and at $\sim 0.08 \mu\text{m}$ (depolymerisation, Figure 6A, top, right, color curves). In consequence, the average MT polymerization is favored. To further understand the dynamics of the bundle extremity, we considered the distance between the MT leader (L_{max}) and the second MT follower (L_{follow}), (Figure 6C and 6D). In control conditions, this distance ($L_{max}-L_{follow}$) is very similar to ($L_{max}-L_{min}$), (compare black curves, Figure 6B and 6C) showing that all the MTs are at steady state, once the initial phase has ended. In presence of MAPs, this distance ($L_{max}-L_{follow}$) raises slowly before reaching a plateau,

which is almost identical for all MAPs, and which is much smaller than the plateau observed in control conditions (about 0.8 μm vs. 3 μm for control). We conclude that, in presence of MAPs, the two closest MT ends forming the bundle tip are in a “bound” regime, characterized by a highly coordinated growth.

The reduction of the amplitude of MT depolymerization by MAP65 should induce an increase of their rescue frequencies. Indeed the model shows that in bundles, rescues are more frequent in the presence of MAP65, at both (+) and (-) ends (Figure 7A, compare black curve vs. color curves). These data are coherent with our experimental observations (Figure 1F). Interestingly, the model predicts a bimodal distribution for rescue frequencies at MT (+) ends (Figure 7A, top, color curves). The model gives a frequency of 2.5 rescue events.min⁻¹ for anti-parallel bundled MTs, and a frequency comprised between 4.3-4.8 rescue events.min⁻¹ for parallel bundled MTs. Moreover this bimodal distribution is observed for all MAP65, including MAP65-4, which has no selectivity for MT polarity. This implies that the differences in rescue frequencies may rely on the intrinsic dynamic properties of (+) and (-) MT ends, and not on the properties of MAP65 bonds. The model also predicts that catastrophe frequencies are decreased by a factor of 10 in the presence of MAP65 at both ends of the MTs (Figure 7B). Thus the combination of reduced catastrophe and increased rescue frequencies results into long polymerization periods and short depolymerization phases allowing MT bundles to grow steadily. Noticeably, the model predicts that MAP65-4 and MAP-X have a stronger effect than MAP65-1 (compare blue and green curves with red curves in Figures 6 and 7). Because MAP65-4 and MAP-X favor the existence of bonds between parallel MTs, these results reinforce the hypothesis that parallel bundled MTs control the growth of the bundles.

DISCUSSION

In this study, using combined *in vitro* and *in silico* approaches, we have shown that two plant MAP65, while bundling MTs, modify the dynamics parameters of MTs that triggers the global increase of the bundle length. Indeed, MAP65-1/4 increase the number of rescue events by reducing the distance over which cross-linked MTs depolymerize, and decrease MT catastrophe frequency so that cross-linked MTs

spend more time on growing than unbundled MTs. In consequence, bundled MTs are longer than the unbundled MTs, and they display a collective behavior that is characterized by a coordinated growth of MT ends, which grow in close vicinity to each other. Conversely, MAP65 do not affect MT growth and shrinkage velocities, in agreement with observations made in living plant cells [23]. Comparable data were reported for the orthologs PRC1 and Ase1 [13], [20], [22]. The changes in the frequency of MT catastrophe and rescue events are correlated with the probability (pR) that a MAP65 inter-MT bond is removed during MT depolymerization. Our model predicts that even labile MAP65 bonds are sufficient to change MT dynamics. Indeed, although MAP65-4 bonds have a high probability (70%) to be removed during MT depolymerization, MAP65-4 cross-linked MTs exhibit an increase of rescue and a decrease of catastrophe events leading to sustained and coordinated growth of bundles.

Furthermore, we also observed reduced but yet detectable effects of MAP65 on MT growth at a concentration of about 0.1 μ M MAP65-1 in experiments and simulations. This suggests that low concentrations of MAP65 that probably occurs in cells might be sufficient to coordinate growth of bundled MTs. In consequence, we assume that *in vivo*, MAP65 stabilizing effects may occur. It will now be important to determine the molecular events that drive the sustained growth of MTs bundled by MAP65.

Noticeably, the model predicts that MAP65 stabilizing effects are predominant in large bundle (> 6 MTs), with two important consequences. First, it might explain why the biased MT dynamics induced by MAP65 has not been observed with PRC1 and Ase1 *in vitro*. In these studies, the dynamics of small bundles was analyzed (about 2 MTs; [19], [20], [22]). Indeed, as predicted by the model, the stabilization by MAP65 is less effective in small bundles. Second, because MAP65 have no significant effect on the dynamic of individual MTs, the growth of a bundled MT must result from its interactions with several adjacent MTs mediated by MAP65 links. Upon crosslinking, MAP65 might adopt a specific configuration, as suggested for PRC1 [19] that modifies the interactions between protofilaments, or changes the on- and off-rates of tubulin at the end of MTs.

As MAP65 present differences in their selectivity for MT polarity, we evaluated the role of MT polarity in the bundle growth using our model. For MAP65-1 that preferentially links MTs of opposite polarity [18], the model predicts that MAP65-1 bundles made of anti-parallel MTs only are shorter than those observed *in vitro*, and

that the presence of parallel bundled MTs was necessary to enhance their growth. The fact that MAP65-1 is able to crosslink both parallel and anti-parallel MTs is consistent with other studies showing that MAP65-1 localizes *in vivo* with parallel and anti-parallel overlap MTs [16], [23]. These data correlate with studies showing that Ase1 and PRC1 have also a strong but not exclusive preference for binding anti-parallel MTs *in vitro* [19], [20], [22]. Furthermore, our model predicts that bonds between parallel MTs control the amplitude of bundle elongation, despite the fact that they are very sensitive to MT depolymerization. In agreement with these data, a recent study showed that the dwell time of MAP65-1 is three times longer on anti-parallel MTs than on parallel MTs and on single MTs [27].

What could be the *in vivo* relevance of the different lifetime of MAP65-1 links between parallel and anti-parallel MTs? The stabilizing effects of MAP65 proteins have not yet been reported *in vivo*. In bundles containing a small numbers of MTs (2 or 3), the selectivity of MAP65-1 for anti-parallel MTs would be an efficient way to sort randomly oriented MTs into anti-parallel bundles, as already suggested for PRC1 [19], or to stabilize anti-parallel MTs in the midzone of the mitotic spindle. In bundles containing a larger number of MTs with mixed polarity such as the plant cortical MTs, parallel MT pairs could modulate the growth of the bundles. These bundles would then contain two populations of bundled MTs: anti-parallel MTs in the core of the bundle, and long leading parallel (+/+) MTs that would determine the length of the bundle. It is interesting to note that a low affinity of MAP65-1 for parallel MTs, rather than a high affinity is very effective in finely tune bundle growth.

Overall, the data obtained in this study suggest that in plant cells, MAP65 influence MT growth. Up to now, only few observations of the dynamic behavior of bundled MTs have been reported *in vivo*. Recently, Shaw and Lucas [28] observed no significant differences between the catastrophe and rescue frequencies of bundled and unbundled MTs in the *Arabidopsis* cortical arrays, although the presence of MAP65 was not correlated with MT dynamics. In the same study, they also reported a smaller relative number of rescue events for bundled MTs, leaving open the possibility than MT bundling could interfere with rescue *in vivo*. In parallel, Lucas et al. [23] studied the dynamic behavior of bundled cortical MTs that are labeled with MAP65-1. These authors observed numerous catastrophe and rescue events within bundles, but the frequencies of these events could not be measured,

because of the complexity of the labeling. Finally, it has been reported that MT (+) ends spend around 75% of their time in growth, punctuated by shorter depolymerizing periods [28]. These observations are reminiscent with the behavior of MTs (+) ends we observed *in vitro*. These *in vivo* observations suggest that the effects of plant MAP65 we observed *in vitro* are rather discreet phenomena *in vivo* that would occur on specific MT subpopulations or at specific stages of the auto-organization of MT arrays. Thus, in line with our observations, we propose that the stabilizing effects of MAP65 could be dominant at the leading MT ends of some bundles, creating long bundles with MT ends in close vicinity. These long bundles (10-30 μm) are observed in plant cells where they wind around the different faces [29], [30]. Because of the closeness of longest MT ends, they may be more resistant to depolymerization when encountering an obstacle [31]. In plant cells, this might explain why MAP65-1, in combination with CLASP (+TIP protein), facilitates the passage of cortical MTs through sharp cell edges [30].

Finally, we may hypothesize that the proteins which control MT end dynamics, such as +TIPs proteins or depolymerizing kinesins, would benefit from MT end closeness, as it could increase their efficiency on adjacent MTs having coordinated growth. This synergy between different mechanisms (i.e. coordinated growth of MT ends by MAP65 and binding of +TIPs or kinesin at MT ends of either cortical MTs or in kinetochores fibers, and in interdigitated MTs during mitosis) may be an efficient way to control the length of bundled MTs.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank J. Gaillard for technical support, I. Arnal for the gift of axonemes, and L. Blanchoin for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

1. Mitchison T, Kirschner M (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312: 237–242.
2. Schulze E, Kirschner M (1986) Microtubule dynamics in interphase cells. *J Cell Biol* 102: 1020–1031.
3. Shaw SL, Kamyar R, Ehrhardt DW (2003) Sustained microtubule treadmilling in *Arabidopsis* cortical arrays. *Science* 300: 1715–1718.
4. Walker RA, O'Brien ET, Pryer NK, Soboeiro MF, Voter WA, et al. (1988)

Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J Cell Biol* 107: 1437–1448.

5. Brun L, Rupp B, Ward JJ, Nedelec F (2009) A theory of microtubule catastrophes and their regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21173–21178.

6. Bartolini F, Gundersen GG (2006) Generation of noncentrosomal microtubule arrays. *J Cell Sci* 119: 4155–4163.

7. Bratman SV, Chang F (2008) Mechanisms for maintaining microtubule bundles. *Trends Cell Biol* 18: 580–586.

8. Jiang W, Jimenez G, Wells NJ, Hope TJ, Wahl GM, et al. (1998) PRC1: a human mitotic spindle-associated CDK substrate protein required for cytokinesis. *Mol Cell* 2: 877–885.

9. Schuyler SC, Liu JY, Pellman D (2003) The molecular function of Ase1p: evidence for a MAP-dependent midzone-specific spindle matrix. Microtubule-associated proteins. *J Cell Biol* 160: 517–528.

10. Hussey PJ, Hawkins TJ, Igarashi H, Kaloriti D, Smertenko A (2002) The plant cytoskeleton: recent advances in the study of the plant microtubule-associated proteins MAP-65, MAP-190 and the *Xenopus* MAP215-like protein, MOR1. *Plant Mol Biol* 50: 915–924.

11. Mollinari C, Kleman J-PP, Jiang W, Schoehn G, Hunter T, et al. (2002) PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone. *J Cell Biol* 157: 1175–1186.

12. Müller S, Smertenko A, Wagner V, Heinrich M, Hussey PJ, et al. (2004) The plant microtubule-associated protein AtMAP65-3/PLE is essential for cytokinetic phragmoplast function. *Curr Biol* 14: 412–417.

13. Liodice I, Staub J, Setty TG, Nguyen NP, Paoletti A, et al. (2005) Ase1p organizes antiparallel microtubule arrays during interphase and mitosis in fission yeast. *Mol Biol Cell* 16: 1756–1768.

14. Caillaud M-C, Lecomte P, Jammes F, Quentin M, Pagnotta S, et al. (2008) MAP65-3 microtubule-associated protein is essential for nematode-induced giant cell ontogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 423–437.

15. Smertenko AP, Chang HY, Wagner V, Kaloriti D, Fenyk S, et al. (2004) The *Arabidopsis* microtubule-associated protein AtMAP65-1: molecular analysis of its microtubule bundling activity. *Plant Cell* 16: 2035–2047.

16. Van Damme D, Van Poucke K, Boutant E, Ritzenthaler C, Inze D, et al. (2004)

In vivo dynamics and differential microtubule-binding activities of MAP65 proteins. *Plant Physiol* 136: 3956–3967.

17. Fache V, Gaillard J, Van Damme D, Geelen D, Neumann E, et al. (2010) Arabidopsis kinetochore fiber-associated MAP65-4 cross-links microtubules and promotes microtubule bundle elongation. *Plant Cell* 22: 3804–3815.
18. Gaillard J, Neumann E, Van Damme D, Stoppin-Mellet V, Ebel C, et al. (2008) Two microtubule-associated proteins of Arabidopsis MAP65s promote antiparallel microtubule bundling. *Mol Biol Cell* 19: 4534–4544.
19. Subramanian R, Wilson-Kubalek EM, Arthur CP, Bick MJ, Campbell EA, et al. (2010) Insights into antiparallel microtubule crosslinking by PRC1, a conserved nonmotor microtubule binding protein. *Cell* 142: 433–443.
20. Janson ME, Loughlin R, Loiodice I, Fu C, Brunner D, et al. (2007) Crosslinkers and motors organize dynamic microtubules to form stable bipolar arrays in fission yeast. *Cell* 128: 357–368.
21. Kiris E, Ventimiglia D, Feinstein SC (2010) Quantitative analysis of MAP-mediated regulation of microtubule dynamic instability in vitro focus on Tau. *Methods Cell Biol* 95: 481–503.
22. Bieling P, Telley IA, Surrey T (2010) A minimal midzone protein module controls formation and length of antiparallel microtubule overlaps. *Cell* 142: 420–432.
23. Lucas JR, Courtney S, Hassfurder M, Dhingra S, Bryant A, et al. (2011) Microtubule-associated proteins MAP65-1 and MAP65-2 positively regulate axial cell growth in etiolated Arabidopsis hypocotyls. *Plant Cell* 23: 1889–1903.
24. Vantard M, Peter C, Fellous a, Schellenbaum P, Lambert a M (1994) Characterization of a 100-kDa heat-stable microtubule-associated protein from higher plants. *Eur J Biochem* 220: 847–853.
25. Hyman A, Drechsel D, Kellogg D, Salser S, Sawin K, et al. (1991) Preparation of modified tubulins. *Methods Enzymol* 196: 478–485.
26. Wicker-Planquart C, Stoppin-Mellet V, Blanchoin L, Vantard M (2004) Interactions of tobacco microtubule-associated protein MAP65-1b with microtubules. *Plant J* 39: 126–134.
27. Tulin A, McClerkin S, Huang Y, Dixit R (2012) Single-molecule analysis of the microtubule cross-linking protein MAP65-1 reveals a molecular mechanism for contact-angle-dependent microtubule bundling. *Biophys J* 102: 802–809.
28. Shaw SL, Lucas J (2010) Intrabundle microtubule dynamics in the Arabidopsis

cortical array. *Cytoskeleton* (Hoboken) 68: 56–67.

29. Barton D, Vantard M, Overall RL (2008) Analysis of cortical arrays from *Tradescantia virginiana* at high resolution reveals discrete microtubule subpopulations and demonstrates that confocal images of arrays can be misleading. *Plant Cell* 20: 982–994.

30. Dhonukshe P, Weits DA, Cruz-Ramirez A, Deinum EE, Tindemans SH, et al. (2012) A PLETHORA-auxin transcription module controls cell division plane rotation through MAP65 and CLASP. *Cell* 149: 383–396.

31. Laan L, Husson J, Munteanu EL, Kerssemakers JWJ, Dogterom M (2008) Force-generation and dynamic instability of microtubule bundles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 8920–8925.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Dynamics of MAP65-1 bundled MTs (A). Scheme of the experimental set-up. MT seed bundles consist of short stable fluorescent and biotinylated MTs cross-linked by MAP65. These MT seed bundles are attached to neutravidin-coated coverslips (step 1). Dynamic MTs elongate from the bundle seeds in the presence of fluorescent tubulin and GFP-MAP65 (step 2). **(B).** Time-lapse of bundles elongating from MT seed bundles in the presence of GFP-MAP65-1 (0.5 μM) observed by TIRF microscopy. Scale bar, 10 μm **(C).** Top panel: Time-lapse of an elongating bundle (arrowhead) simultaneously observed in the red Alexa 568-tubulin channel (top row) and green GFP-MAP65-1 channel (middle row). Lower row is the merged image. Bottom panel: Kymographs of the elongating bundle highlighted by the arrowhead. Tubulin (red) and GFP-MAP65-1 (green) traces are superimposable, indicating the binding of MAP65-1 is concomitant with MT elongation. **(D).** Examples of kymographs of MT bundles. Solid lines correspond to MT plus ends that elongate rapidly, and dotted lines correspond to MT minus ends. Schemes on top of the kymographs show the putative organization of MTs in the bundle. The kymograph shown on the left corresponds to a bundle with a large but unknown number of MTs. The right kymograph shows a bundle with two anti-parallel MTs. **(E).** Length history plots of 3 single MTs in the absence of MAP65-1 (left panel), and 3 MT bundles in the presence of increasing concentrations of MAP65-1 (three right panels). **(F-G).** Estimation of rescue frequencies (F) and catastrophe frequencies (G) of MTs in

bundles as a function of MAP65-1 concentration. The slope of the linear fit for catastrophe frequencies is not significantly different from 0. **(H)**. Duration of elongation phases after a rescue event as a function of MAP65-1 concentration. Black dots indicate the mean values. **(I)**. Depolymerization length of MTs in the presence of various concentrations of MAP65-1.

Figure 2. Effect of MAP65-1 on the dynamics of individual MTs. **(A)**. Kymographs of single MTs that elongate in the absence of MAP65-1 (left kymograph), or in the presence of 0.1 μM of GFP-MAP65-1 (right kymograph). In the first kymograph, a single Alexa-488 MT (green) elongates from an Alexa-568 MT seed (red). In the right kymograph, Alexa-568 MT (red) elongates from an Alexa-568 MT seed (red) in the presence of GFP-MAP65-1 (green). The yellow color reveals the binding of GFP-MAP65-1 on the MT. Schemes on top of the kymographs show the orientation of MT ends. Bottom images show the MTs used to draw the kymographs. **(B)**. Length history plots of 3 single MTs over time in the absence and in the presence of 0.1 μM MAP65-1. **(C-D)**. Distribution of elongation rates (C) and shortening rates (D) of single MTs in the absence (top row) or in the presence of 0.1 μM MAP65-1 (bottom row). Data for MT (+) and (-) ends are shown in blue and green respectively. Average rates and population size are indicated. **(E)**. Duration of elongation phases of single MTs after a rescue event in the absence and in the presence of 0.1 μM MAP65-1. Black dots indicate the mean duration of elongation phases. **(F-G)**. Depolymerization length of MTs in the absence and in the presence of 0.1 μM MAP65-1, for MT minus end (F) and MT plus end (G).

Figure 3. Modelisation of the dynamics of individual MTs. **(A)**. Scheme of a dynamic MT (green) elongating from a stable MT seed (red). The different parameters of MT dynamics are (i) growth rates at (+/-) ends (V_G^+/V_G^-), (ii) shrinkage rates (V_s^+/V_s^-), (iii) catastrophe/rescue frequencies at MT (+) ends ($f_{\text{res}}^+/f_{\text{cat}}^+$) and (-) ends ($f_{\text{cat}}^-/f_{\text{res}}^-$). **(B)**. Experimental kymograph of an individual MT fluctuating away from the seed (dark band at the kymograph center). Scheme on right of the kymograph shows the orientation of MT ends. **(C)**. History plots of two individual MTs observed by TIRFm. Blue and green traces correspond respectively to MT (+) and (-) ends. **(D)**. Kymograph of two simulated independent MTs elongating from a seed (red). MT (+) ends are in blue; MT (-) ends are in green. **(E)**. Corresponding

fluctuation plots over time (same code color as in C).

Figure 4. A microscopic model for the growth of MTs in bundles. (A). Rationale used to model the effect of a MAP65 bond on MT depolymerization. Stable MT seeds are in red, dynamic MTs are in green. For sake of simplicity, only one pair of MTs cross-linked by 3 MAP65 (bars) is shown. The upper MT end undergoes a catastrophe event (left panel) and MT depolymerizes until it reaches a MAP65 bond (shown in red) at the end of the cross-linked MT (middle panel). At this stage, the MAP65 either detaches from MT with probability pR (right, top panel), or stays bound to the MTs with a probability $(1-pR)$ (right, bottom panel). In the first case, the MAP65 bond is removed and the MT continues to shrink. In the second case, the MAP65 bond resists MT depolymerisation, which stops. **(B).** During depolymerization, MAP65 (black bars) detaches from anti-parallel MTs with a probability pR_{ap} , or detach from parallel bundled MTs with a probability pR_p . The color code is the same as in (A). **(C).** Effect of the value of pR_{ap} and pR_p on the amplitude of MT depolymerization. The upper MT end undergoes a catastrophe event and MT depolymerizes (left panel) before it reaches the end of a cross-linked MT (right panel). At low pR_{ap} or pR_p (top panel), most of the MAP65 molecules stay bound to the MTs. Therefore MT depolymerization is stopped at the vicinity of the end of the adjacent MT (black broken line). If pR_{ap} or pR_p is high (labile MAP bonds; bottom panel), MT depolymerization may persist behind the end of a cross-linked MT, thus generating short bundles (red broken line).

Figure 5. Growth of MTs bundled is dependent on the lifetime of MAP65 links. Results of MT growth simulation in the presence of MAP65-4 (A-E) and MAP65-1 (F-K). **(A).** Diagram showing the predicted maximal length of MT bundles that elongate for 20 min in the presence of 0.25 μM MAP65-4, as a function of the number of MTs in the bundle (horizontal axis) and removal probability pR (vertical axis). Predicted bundle length (μm) is coded by the color bar on the right. Black dot indicates the conditions at which predicted and experimental bundle have the closest lengths (explained in Figure S6). **(B).** Diagram of the error between calculated and measured maximal bundle length for different combinations of the number of MTs in the bundle (horizontal axis), removal probability pR (vertical axis), and for all available MAP65-4 concentrations. The error (μm) as coded by the color bar on the right, presents a

marked minimum for a number of MTs above 10 MTs/bundle and a removal probability pR about 0.7. **(C)**. Experimental kymograph of MTs (green) bundled by 0.25 μM MAP65-4. White plain lines indicate MT (+) ends; yellow dotted lines indicate MT (-) ends. **(D-E)**. Kymographs of simulated bundles showing the dynamics of MTs (E) and the MAP65-4 binding (F) in the same conditions as in (D). The blue color represents the MAP65-4 binding wave as the MT elongation progresses. **(F)**. Diagram of the error between calculated and measured maximal length of bundles, for different combinations of pR_{ap} and pR_p . Simulations were made with MAP65-1 concentrations ranging from 0.1 μM to 1.5 μM , and the number of MTs was kept fixed at 10. **(G)**. Diagram of the error between calculated and measured maximal bundle length for different combinations of the number of MTs in the bundle (horizontal axis) and removal probability from parallel MTs pR_p (vertical axis). We used MAP65-1 concentrations in the range from 0.1 μM to 0.5 μM and the removal probabilities of MAP65-1 connecting anti-parallel MTs pR_{ap} were taken in the interval [0, 0.5]. The error as coded by the color bar on the right, presents a marked minimum for a number of MTs above 10 MTs/bundle and a removal probability pR_p around 0.9. **(H)**. Predicted maximal bundle length for different combinations of the MT number in the bundle and removal probabilities of MAP65-1 connecting parallel MTs (pR_p). The diagram was obtained using a MAP65-1 concentration of 0.5 μM and removal probabilities pR_{ap} in the range [0, 0.5]. **(I)**. Experimental kymograph of MTs (green) bundled by 1 μM MAP65-1. White plain lines indicate MT (+) ends. Note that (-) ends are buried in the kymograph. **(J-K)**. Kymographs of simulated bundles showing the dynamic of MTs (F) and the MAP65-1 binding (G) in the same conditions as in (E). The blue color represents the MAP65-1 binding wave as the MT elongation progresses.

Figure 6. Model predictions for MT dynamics in bundles in the presence of MAP65. Simulations were performed with MAP65 binding rates of $k_{on}=10 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$, $k_{off}=0 \text{ s}^{-1}$, and MAP65 concentration of 0.1 μM ; the number of MTs in the bundle is 10. The MAP65 removal probabilities are, for MAP65-1, $pR_{ap}=0.1$ and $pR_p=0.8$, for MAP65-4, $pR_{ap}=pR_p=0.25$, and for MAP-X $pR_{ap}=0.8$ and $pR_p=0.1$. In marked contrast with MAP65-1, the hypothetical MAP-X favors pairs of parallel MT (low pR_p and high pR_{ap}). In control conditions, we have $pR_{ap}=pR_p=1$. Each distribution curve corresponds to 20 independent model runs. **(A)**. The distribution of polymerization

length (left column) or depolymerization length (right column) is shown for all (+, top row) and (-, bottom row) MT ends in the bundle. The inset shows the depolymerization of the control bundle. Note the change in the scale of the abscissa axis. **(B)**. Average distance between the longest (leader) MT and the shortest MT (last MT follower) ($L_{\max}-L_{\min}$) in the bundle. **(C)**. Average distance between the leader MT and the next follower MT ($L_{\max}-L_{\text{follow}}$). **(D)**. Cartoon showing how ($L_{\max}-L_{\min}$) and ($L_{\max}-L_{\text{follow}}$) are defined. Note that the identity of the leader and follower MTs can change in the course of time. The seed and the dynamic section of each MT are shown respectively in red and in green.

Figure 7. Model prediction for catastrophe and rescue frequencies in the presence of MAP65. Parameters for simulation are given in Figure 6. The distribution of rescues (A) and catastrophe (B) frequencies is shown for the plus (top row) and the minus (bottom row) MT ends in the bundle.

TABLES

Table 1. Frequencies of catastrophe and rescue events of single MTs in the presence of MAP65-1.

| | 0 μM MAP65-1 | 0.1 μM MAP65-1 |
|--------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| f_{cat} (+) end | 0.131 \pm 0.074 N=30 | 0.146 \pm 0.080 N=14 |
| f_{cat} (-) end | 0.168 \pm 0.108 N=20 | 0.114 \pm 0.047 N=10 |
| f_{res} (+) end | 3.361 \pm 2.098 N=23 | 2.749 \pm 1.300 N=14 |
| f_{res} (-) end | 4.641 \pm 3.675 N=27 | 7.039 \pm 3.223 N=10 |

Frequencies of catastrophe (f_{cat}) and rescue (f_{res}) of single MTs in the absence (left column) and in the presence of 0.1 μ M MAP65-1 (right column) are given for MT (+) and (-) ends (mean frequency \pm S.E.). N = number of values.

Table 2. Experimental values used to simulate the dynamics of individual MTs.

| MT | Growth rate ($\mu\text{m}/\text{min}$) | Shrinkage rate ($\mu\text{m}/\text{min}$) | Catastrophe rate (events/min) | Rescue frequency (events/min) |
|------------------------|--|---|---|---|
| Plus end (1451 min) | 1.56±0.012 (N=245) | 14.25±0.276 (N=145) | 0.236 | 0,091 |
| Plus end (1599 min) | 0.56±0.006 (N=271) | 40.49±1.071 (N=153) | 0.197 | 0.172 |

| MT | Pause frequency (events/min) | Growth time (min) | Shrinkage time (min) | Pause time (min) |
|------------------------|--|--|---|---------------------------------------|
| Plus end (1451 min) | - | 3.56±0.118 (N=359) | 0.56±0.006 (N=271) | - |
| Plus end (1599 min) | 0.012 (N=21) | 4.75±0.209 (N=273) | 0.26±0.048 (N=259) | 1.84±0.309 (N=19) |

Kymographs and length history plots of simulated MTs are shown in Figure 3D and 3E.

Table 3. MT length in the presence of MAP65-4.

| [MAP65-4] (μM) | observed length (μm) | predicted length (μm) |
|---|---|--|
| 0.00 | 7.5 ± 4.7 | 7.54 |
| 0.10 | 10.1 ± 4.1 | 10.3 |
| 0.25 | 18.3 ± 7.2 | 22.0 |
| 0.50 | 26.4 ± 14.8 | 32.1 |

Comparison of the experimentally observed MT maximal length (left column) and the MT maximal length predicted by the model (right column). Data indicate the mean value \pm S.E.

Table 4. MT length in the presence of MAP65-1.

| [MAP65] (μM) | Observed length of bundled MTs of mixed polarity ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$) | Predicted length of bundled MTs of mixed polarity (μm) | Predicted length of anti-parallel bundled MTs (μm) |
|---|--|---|---|
| 0.00 | 7.5 ± 4.7 | 7.54 | |
| 0.10 | 15.5 ± 8.7 | 18.6 | 9.97 |
| 0.15 | 16.2 ± 6.8 | 18.1 | |
| 0.25 | 23.9 ± 8.7 | 24.0 | 17.6 |
| 0.50 | 20.9 ± 6.5 | 23.6 | |
| 0.75 | 18.2 ± 7.8 | 19.1 | |
| 1.00 | 26.4 ± 11.7 | 29.0 | 18.3 |
| 1.25 | 24.9 ± 8.6 | 25.2 | |
| 1.50 | 27.0 ± 4.7 | 28.8 | |

Comparison of the experimentally observed MT maximal length (left column) and the MT maximal length predicted by the model (middle column). The right most column gives the predicted MT maximal length in MAP65-1-stabilized bundles assuming connections between anti-parallel MTs only. In this case, the calculated maximal length is systematically lower than the experimental one.

Figure 1

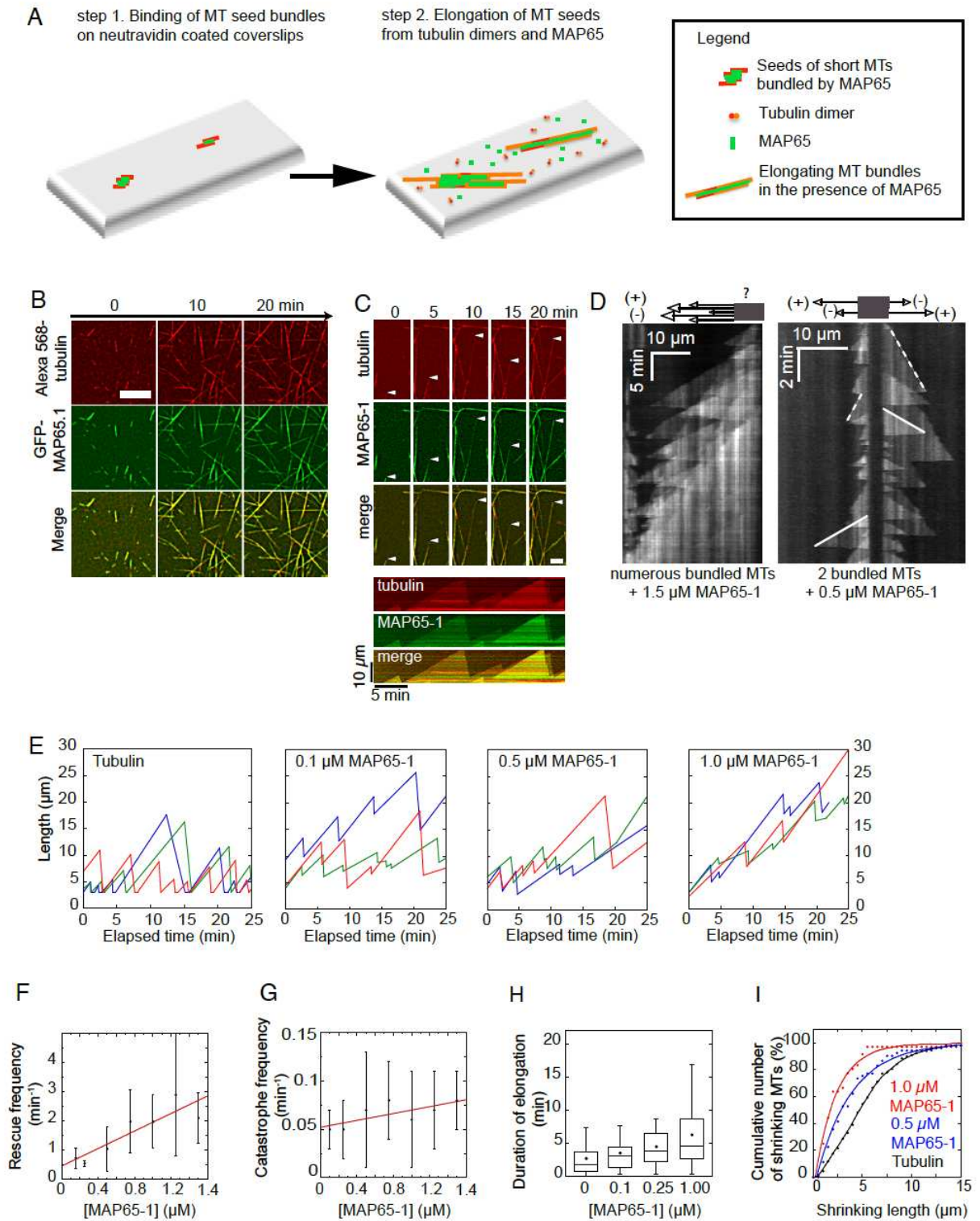


Figure 2

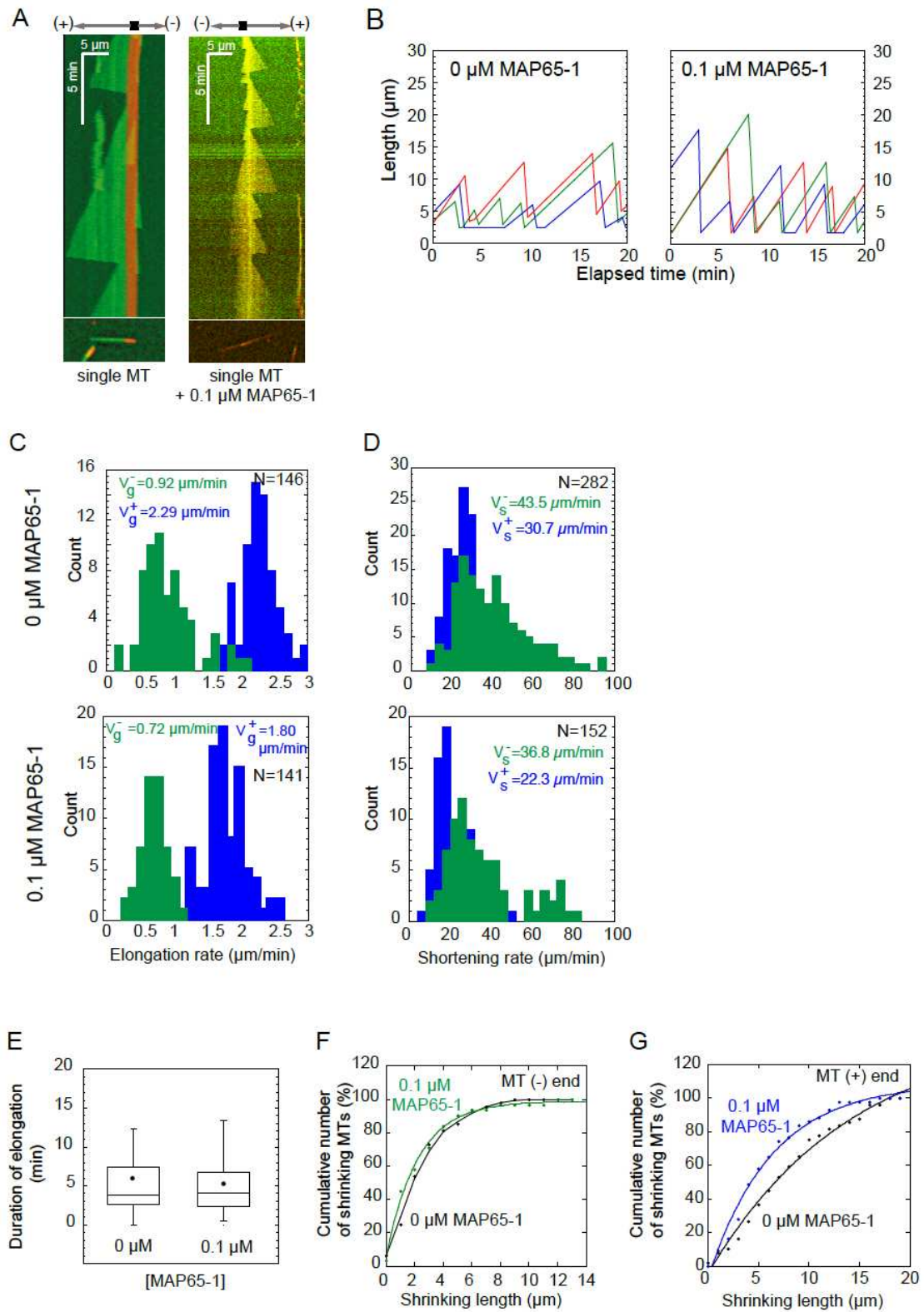


Figure 3

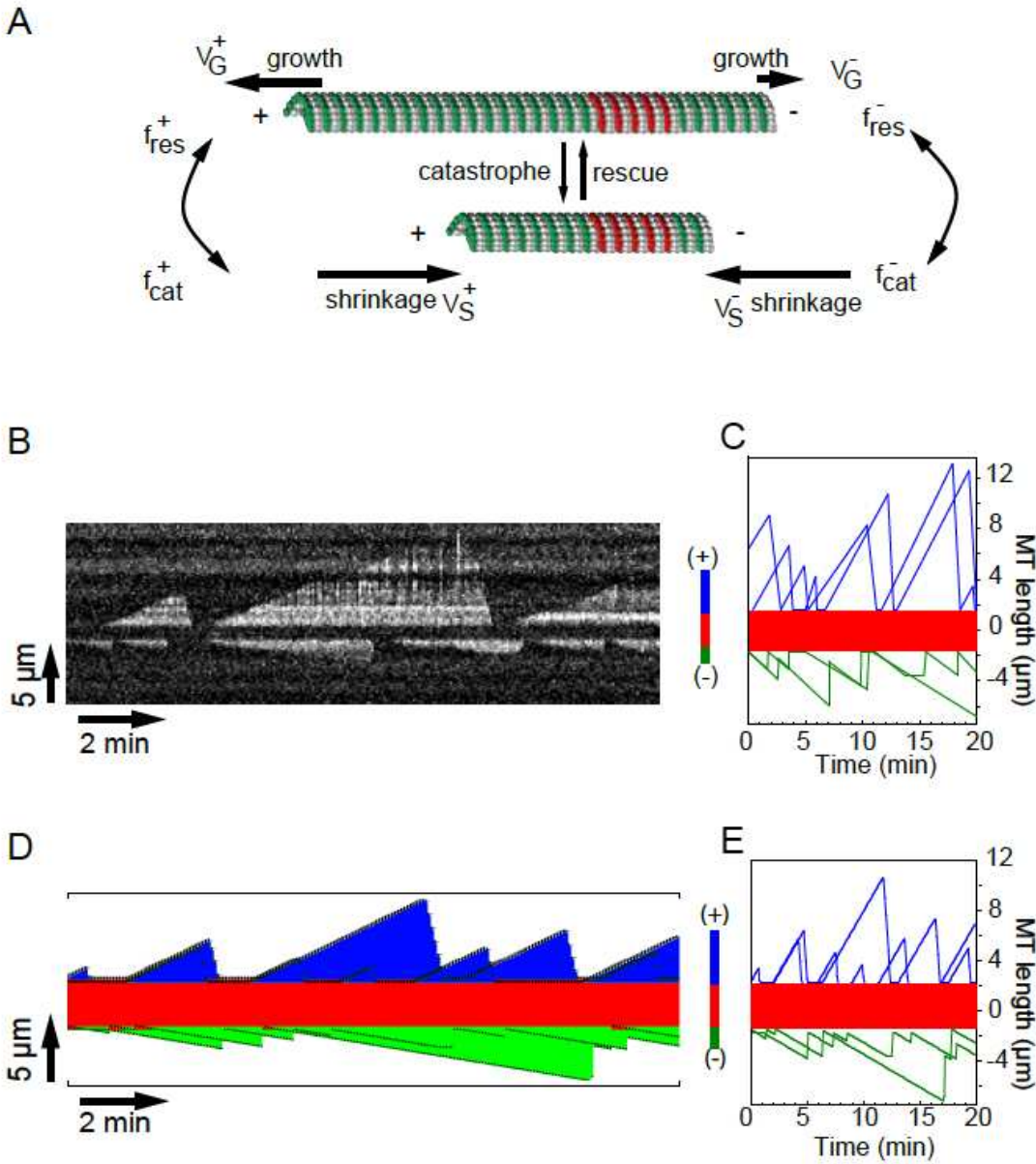


Figure 4

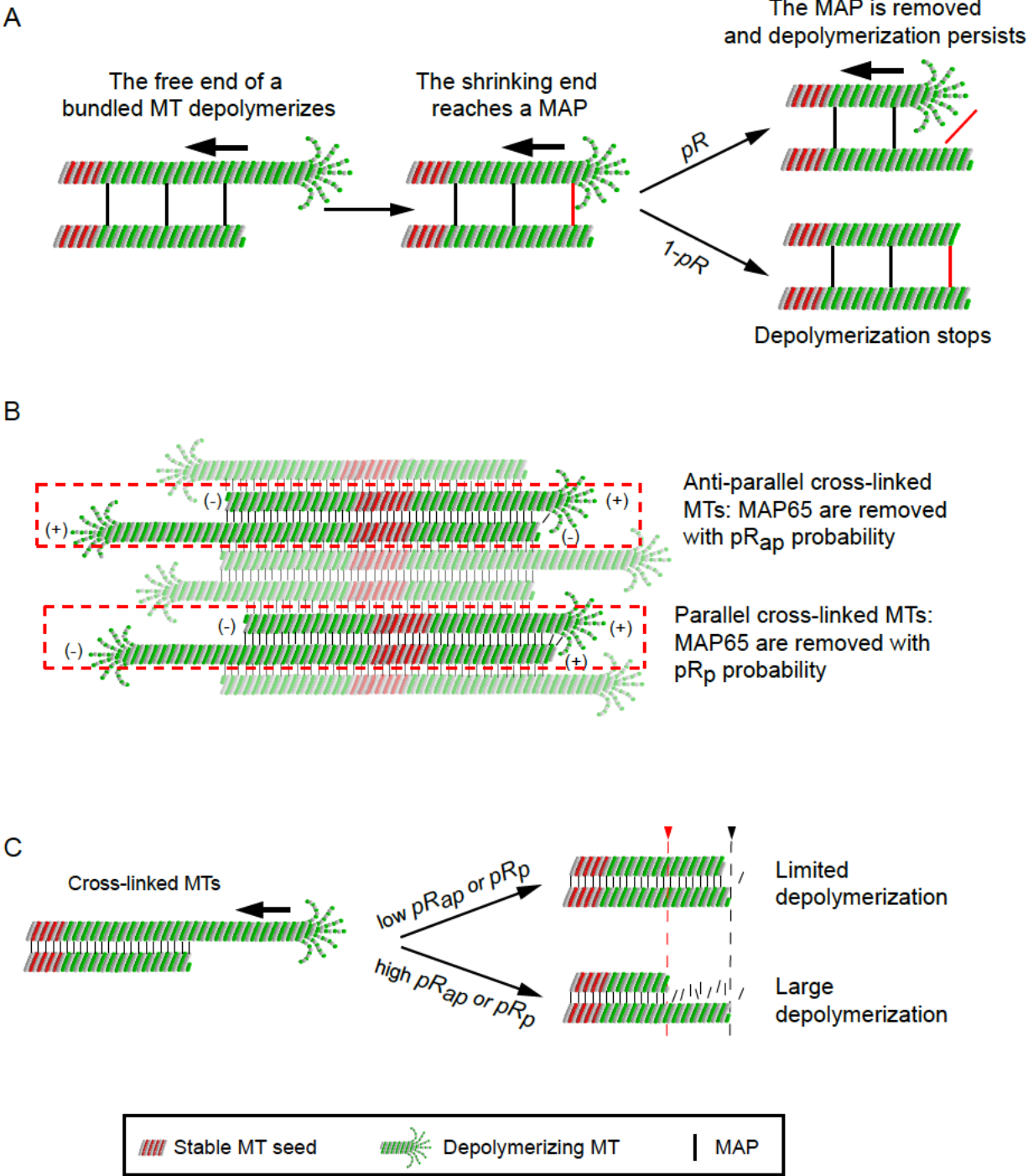


Figure 5

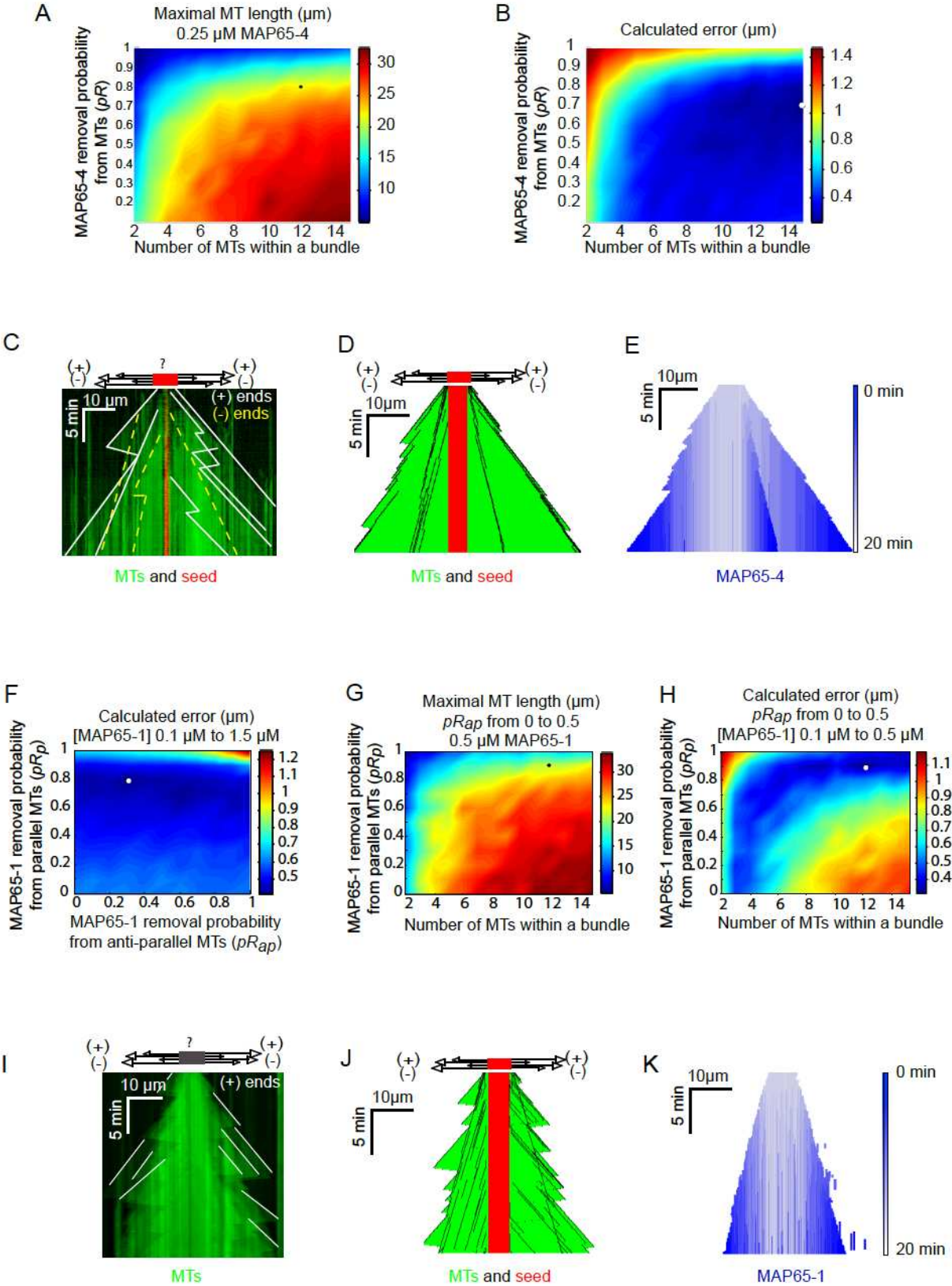


Figure 6

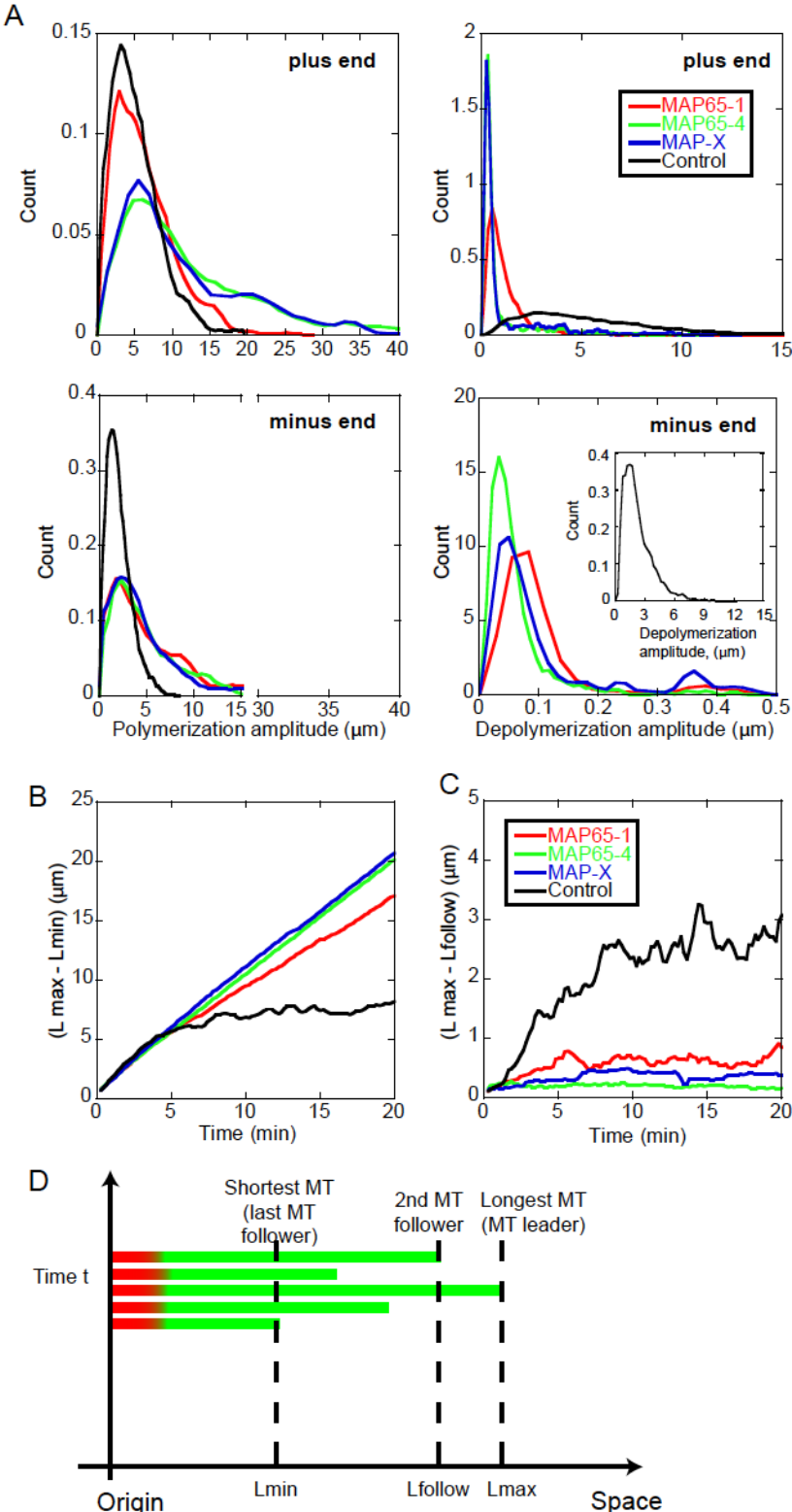
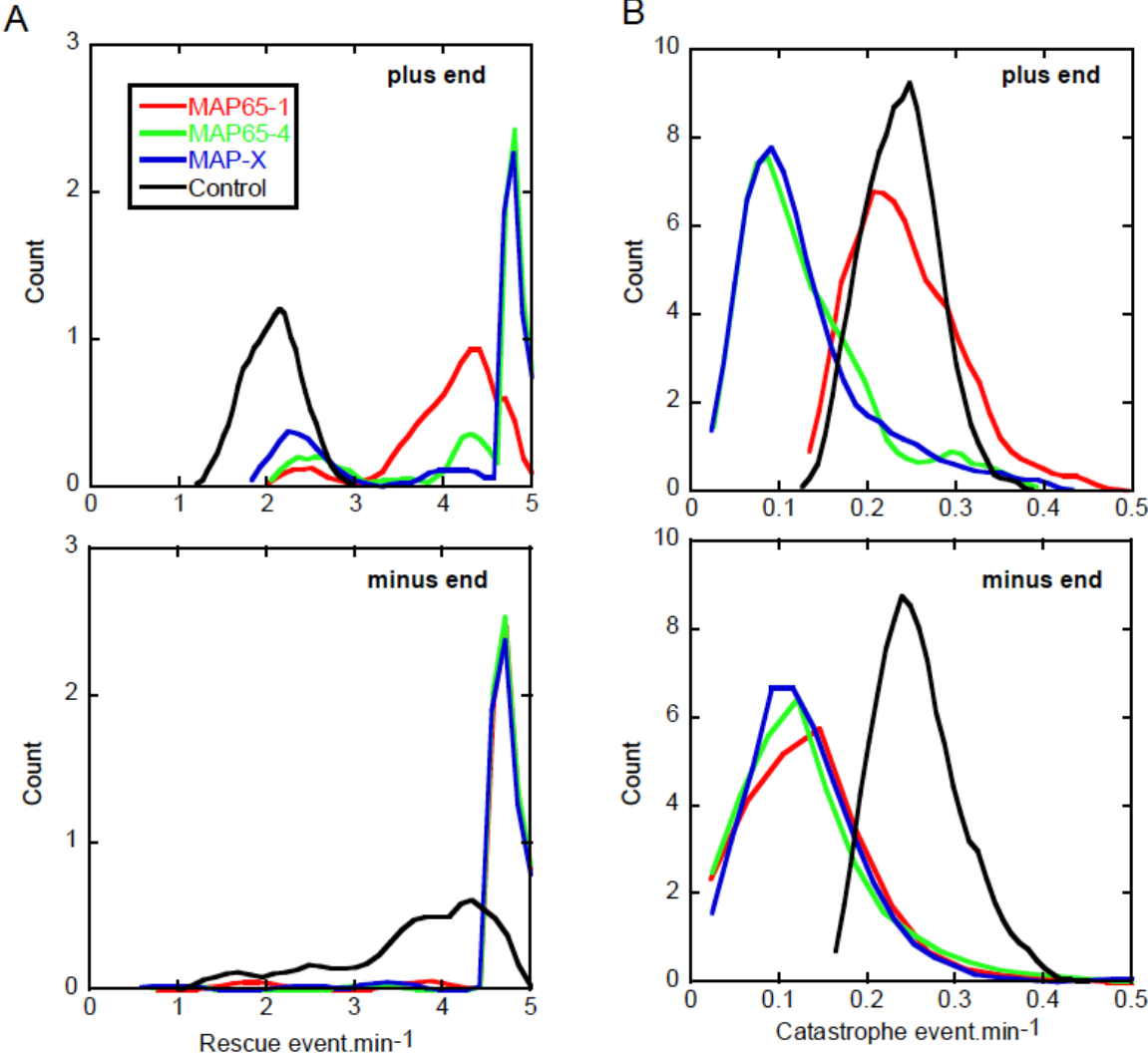


Figure 7



MAP65 coordinate microtubule growth during bundle formation

Virginie Stoppin-Mellet, Vincent Fache, Didier Portran, Jean-Louis Martiel, Marylin Vantard

Laboratoire de Physiologie Cellulaire & Végétale, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant (iRTSV), Centre National de la Recherche Scientifique/Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives/Institut National de la Recherche Agronomique/Université Joseph Fourier (CNRS/CEA/INRA/UJF), Grenoble F-38054, France

This file contains supporting methods and legends of supplementary figures and movies.

SUPPORTING METHODS. Modeling microtubules (MT) growth in the presence of microtubules associated proteins (MAP).

In section A, we present the kinetic model for the growth and shrinkage phases of isolated MT accounting for growth and shrinkage phases. The kinetic parameters were determined from the analysis of MT dynamics observed with TIRF microscopy in the absence of MAPs. In section B, we introduce the MAP65-1/4 assuming the binding of parallel or anti-parallel MT in a bundle. We hypothesize that the presence of MAP bonds between MT limits MT shortening phases and synchronizes MT growth. In the third section C, we will present how the model is simulated and compared to experimental results.

A. Kinetics of isolated microtubules.

We assume that microtubules (MT) grown from taxol-stabilized seeds are aligned along an axis with the initial seed centered at the axis origin.

For a single MT, the positions of its plus (+) and minus (-) ends are given by stochastic, time-dependent variables, respectively, $X(+,t)$ and $X(-,t)$. Since the initial orientation of the seed is totally random, the plus (resp. the minus) MT end positions $X(+,t)$ and $X(-,t)$ have positive/negative abscissae along the horizontal axis with the same probability.

To simplify the model further, we use constant growth/shrinkage rates, assuming that the GTP-tubulin dimers concentration in the medium is largely above the critical concentration of the plus/minus MT ends. During growth or shrinking phases, the

position of the MT ends changes depending on the polymerization/depolymerization rates associated with the MT end type (plus/minus) according to

$$X(+, t+h) = X(+, t) + hV_+^G, \quad (1)$$

during MT growth and

$$X(+, t+h) = X(+, t) - hV_+^S, \quad (2)$$

during MT shrinkage. Note that Eqs. (1) and (2) are valid if a (+) end is located on the right of the origin; for a MT with the opposite orientation, one has

$$X(+, t+h) = X(+, t) - hV_+^G, \quad (3)$$

$$X(+, t+h) = X(+, t) - hV_+^S \quad X(+, t+h) = X(+, t) + hV_+^S. \quad (4)$$

In equations (1-4), t represents the time at which a rescue (resp. catastrophe) event has occurred in the past; in addition, it is implicitly assumed that no catastrophe (resp. rescue) event has occurred in the time interval $[t, t+h]$.

Parameters V_+^G or V_+^S are, respectively, the growth and shrinkage rates of plus ends experimentally determined from TIRFm analysis (Table S1). The case of minus ends movement is treated using the same formalism:

$$X(-, t+h) = X(-, t) + hV_-^G \quad X(-, t+h) = X(-, t) - hV_-^G, \quad (5)$$

$$X(-, t+h) = X(-, t) + hV_-^S \quad X(-, t+h) = X(-, t) + hV_-^S. \quad (6)$$

for a minus end located on the left of the origin of abscissae. Conversely, a minus end located on the right side of the origin changes its position according to

$$X(-, t+h) = X(-, t) - hV_-^G \quad X(-, t+h) = X(-, t) + hV_-^G, \quad (7)$$

$$X(-, t+h) = X(-, t) - hV_-^S \quad X(-, t+h) = X(-, t) - hV_-^S. \quad (8)$$

The corresponding growth and shrinkage rates for minus ends are listed in Table S2. The presence of non-hydrolysable GTP associated with the tubulin dimers in the MT seed constraints the plus and minus ends positions to be always on the right (resp. left) of the seed ends. For example, if a MT has its plus end on the right side of the origin and if we denote by X_+^{Seed} X_+^{Seed} (resp. by X_-^{Seed} X_-^{Seed}) the positions of the plus (resp. minus) seed ends, one has, for all time t

$$X(-, t) \leq X_-^{Seed} < 0 < X_+^{Seed} \leq X(+, t). \quad X(-, t) \leq X_-^{Seed} < 0 < X_+^{Seed} \leq X(+, t). \quad (9)$$

A similar relation holds for MTs with a reverse orientation

$$X(+, t) \leq X_+^{Seed} < 0 < X_-^{Seed} \leq X(-, t). \quad X(+, t) \leq X_+^{Seed} < 0 < X_-^{Seed} \leq X(-, t). \quad (10)$$

In addition to growth and shrinkage phases, we introduced pauses which start when a shrinkage phase was prematurely ended as the position of the MT (plus/minus) end coincides with that of the seed (plus/minus) end, i.e.

$$X(+,t) = X_+^{Seed} X(+,t) = X_+^{Seed} \text{ or } X(-,t) = X_-^{Seed} X(-,t) = X_-^{Seed}. \quad (11)$$

Given (i) the average duration of the different phases determined from the experiments (Table S1), (ii) the rates of growth and shrinkage (Table S1) and (iii) the probabilities for transitions between growth, shrinkage or pause phases (Table S2), one can simulate the position of the plus or minus ends by the following algorithm (here the algorithm is presented for the plus end; the algorithm for the minus end has a similar structure).

We assume that a MT plus end is growing ('G'), shrinking ('S') or pausing ('P'). The dynamics of MT ends is based on the alternation of G, S or P phases whose duration is a random time drawn from exponential distribution of parameters τ_+^G , τ_+^S or τ_+^P . These parameters are the average duration of, respectively, growth (τ_+^G), shrink (τ_+^S) or pause (τ_+^P) phases for a (+) end (see Table S1 for the definition and values of these parameters; the average duration of growth, shrink and pause phases of the (-) ends are, respectively, τ_-^G , τ_-^S or τ_-^P). In addition, we assume that transitions between growth, shrinkage and pause phases are Markovian, i.e. the probability that a particular MT extremity starts a new phase of type $\mu(t)$ at time t depends only on the state $x(t)$ of that extremity just at the transition time. Therefore, a (+/-) MT end is characterized by (i) its phase status ($x(t_0) \in \{G, S, P\}$), where t is the running time and t_0 is the beginning of the phase; one has always $t \geq t_0$, (ii) the duration of the phase ($T_{+/-}^{x(t_0)}$). The simulation algorithm consists into two parts: (i) initialization of the MT state at $t = 0$ and (ii) MT dynamics simulation.

Initialization. At $t = 0$, choose the MT end state among (G, S, P) according to

the probability distribution $(\frac{\tau_+^G}{A}, \frac{\tau_+^S}{A}, \frac{\tau_+^P}{A}) (\frac{\tau_+^G}{A}, \frac{\tau_+^S}{A}, \frac{\tau_+^P}{A})$, with $A = \tau_+^G + \tau_+^S + \tau_+^P$. Once the state $x(0)$ is chosen ($x(0) \in \{G, S, P\}$), draw the duration of this state,

denoted by $\mathcal{T}_+^{x(0)}$, using the exponential distribution of parameter $\tau_+^{x(0)}$. Because the initial time is arbitrary, change the duration of the initial phase into $\mathcal{T}_+^{x(0)} \rightarrow \theta \mathcal{T}_+^{x(0)}$, $T_+^{x(0)} \rightarrow \theta T_+^{x(0)}$, where θ is a random number drawn from the uniform distribution over the interval $[0,1]$. In addition, set the velocity of the MT end to $V_+^{x(0)}$ (note that $V_+^p = 0$). The case of minus ends is treated using the same initialization procedure. After initialization, a (+/-) MT end is characterized by a set of four parameters $(t_0, x(t_0), \mathcal{T}_{+/-}^{x(t_0)}, V_{+/-}^{x(t_0)})$, namely the beginning of the phase, the status of the phase, the phase duration and the growth/shrinkage rate.

MT dynamics.

1. For all time t such that $t_0 \geq t \geq \mathcal{T}_+^{x(t_0)}$ or $t_0 \leq t \leq T_+^{x(t_0)}$, use relations (1-2) or (3-4) to update the MT end position using growth/shrinkage rate $V_+^{x(t_0)}$. If the MT plus end position coincides with the seed plus end X_+^{Seed} at some intermediate time point t^* ($t_0 \geq t^* \geq \mathcal{T}_+^{x(t_0)}$), then stop the dynamics and freeze the MT position at X_+^{Seed} until completion of the phase.
2. At the end of the $x(t_0)$ phase, i.e. at time $t_0 + \mathcal{T}_+^{x(t_0)}$ or $t_0 + T_+^{x(t_0)}$, use the probabilities transitions listed in Table S2 to determine the next MT end state given that the MT was in state $x(t_0)$ at $t_0 + T_+^{x(t_0)}$. Once the new MT end state is chosen (this state is denoted $x(t_0 + \mathcal{T}_+^{x(t_0)})$), draw its duration from the exponential distribution of parameter $\tau_+^{x(t_0 + \mathcal{T}_+^{x(t_0)})}$; change the growth/shrinkage rate to $V_+^{x(t_0 + \mathcal{T}_+^{x(t_0)})}$.
3. Update time, the set of MT parameters according to:

$$t_0 \rightarrow t_0 + \mathcal{T}_+^{x(t_0)}, \quad x(t_0) \rightarrow x(t_0 + \mathcal{T}_+^{x(t_0)}), \quad \mathcal{T}_+^{x(t_0)} \rightarrow \mathcal{T}_+^{x(t_0 + \mathcal{T}_+^{x(t_0)})}, \quad T_+^{x(t_0)} \rightarrow T_+^{x(t_0 + T_+^{x(t_0)})},$$

$$V_+^{x(t_0)} \rightarrow V_+^{x(t_0 + \mathcal{T}_+^{x(t_0)})}, \quad V_+^{x(t_0)} \rightarrow V_+^{x(t_0 + T_+^{x(t_0)})}.$$

Then, go back to step 1.

The case of minus ends is treated using the same algorithm.

B. MAPs bonding and the control of MT kinetics.

In section A, we presented the algorithm for the dynamics of isolated MT grown from stable seeds. In this section, we consider bundles of MT, with random orientation (i.e. the MT in the bundles can form parallel or anti-parallel MT pairs, with the same probability). The two MAPs under consideration (MAP65-1 and MAP65-4) are known to have different mechanism for MTs bonding and are sensitive to the relative MT orientation in a pair (i.e. parallel or anti-parallel MTs). MAP65-4 is indifferent to the MT pairing whereas MAP65-1 is reported to connect anti-parallel MTs only.

However, the dynamics of MTs bundles in the presence of MAP65-1 is best understood if we relax this constraint and allow bonding between parallel MTs (see the main text for a discussion of this assumption and its consequences for the MT dynamics).

B1. MAPs binding modeling.

Assuming that the MTs are regularly arrayed with their positions located on the vertices of a hexagonal lattice (which is equivalent to assume maximal compactness in the bundle), we determine the number of possible pairs between adjacent MTs in the bundle, as shown in Figure S7. Let i and j be the indexes of two the MTs in a pair. From the positions of the plus/minus ends of MT i and j , MAPs can connect the two MTs over the spatial domain $[X(i, j, 1), X(i, j, 2)] [X(i, j, 1), X(i, j, 2)]$ defined by

$$\max(X_j(-, t), X_i(-, t)) = X(i, j, 1) < 0, \quad (12)$$

$$0 < X(i, j, 2) = \min(X_j(+, t), X_i(+, t)) < X(i, j, 2) = \min(X_j(+, t), X_i(+, t)), \quad (13)$$

so that

$$X_i(-, t) \leq X(i, j, 1) < X(i, j, 2) \leq X_j(+, t) \quad (14)$$

and

$$X_j(-, t) \leq X(i, j, 1) < X(i, j, 2) \leq X_j(+, t) \quad (15).$$

Note that equations (12-15) implicitly assume that the plus (resp. minus) ends have positive (resp. negative) abscissas; otherwise, relations (11-12) should be changed accordingly. The extension of the domain for MAP65 binding and its definition is shown in Figure S7. Therefore, the number of bound MAPs is determined as a binding reaction on a linear lattice with $N_{sites}N_{sites}$ and controlled by the on/off

parameters defined in Table S3. The dynamics of MAP binding on anti-parallel MTs obeys similar equations, using appropriate on/off binding rates and linear MAP density (see Table S3).

The presence of MAPs does not change the kinetic parameters (growth/shrinkage rates; duration of growth and shrinkage phases). Therefore, MTs undergo growth/shrinkage dynamics at their ends as if they were isolated. If the MT dynamics in the pair (i,j) is associated with an absolute increase of $X(i,j,2) - X(i,j,1)$, the number of available sites for MAPs binding is increased and a wave of bound MAPs follows the growing MT ends. Conversely, if the MT dynamics results in a reduction of the spatial domain $[X(i,j,1), X(i,j,2)]$, one should consider explicitly the interactions between shrinking ends and bound maps. This is the object of the next section.

B2. Control of MT dynamics by MAPs.

We assume that MT (j) is undergoing shrinkage and that the position of its (+) end, denoted by $X_j(+, t)$, is approaching $X(i, j, 1)$; in the meantime, the MT (i) is either pausing or elongating. If the position of the (+) end of MT (j) , $X_j(+, t)$, reaches a MAP position, we assume that the piece of MT (see Figure 5) bound to the MAP and the MAP itself is removed with a probability $pR_{p,ap}$ or stays with a probability $1 - pR_{p,ap}$ (see Table S2 for the definition of these parameters). If the MAP is removed, shrinkage can resume until a new MAP is encountered; otherwise, the shrinkage phase is stopped prematurely. Note that pR does not represent the probability of unbinding the MAP from the MT, an event under the control of parameter k_{off} . pR represents the possibility that a piece of the MT (one protofilament fragment, Figure 5) can be removed with the MAP itself during depolymerization.

The extent of the MT shrinkage is limited either (1) if the pR is extremely low (close to zero) or (2) if the MAP density is very high. On one hand, low pR favors MAPs resisting MT shrinkage. On the other hand, high MAP density increases the number of MAP removals. Since each of these events has a probability pR to occur, the probability to observe N successive removals over a distance L is $P(N,L) = (pR_{p,ap})^{L\rho}$, where ρ is the MAP linear density and $N = L\rho$. Therefore, if ρ is large, $P(N,L)$ is close to zero.

C. Model validation.

We first simulated the dynamics of single MTs that elongate from individual stable seed using the polymerization and depolymerization rates, the frequency of catastrophe and rescue events extracted from kymographs corresponding to the dynamics of individual MTs observed in TIRFm (Table 2; Figure 3A-C; Figure S4; Movie S1). The corresponding simulated kymographs of individual MTs are presented in Figure S5 D-E and Movie S4. Comparison between model and experiments as well the color mapping used in Figure 5 are obtained according the procedure shown in Figure S6.

Table S1. List of variables and parameters used in the model for MT dynamics.

| Variable | Definition | Units | |
|-----------------------|---|---------------|--|
| t | time | s. | |
| $X(+,t)$ | Position of the plus end at time t | μm | |
| $X(-,t)$ | Position of the minus end at time t | μm | |
| $\mathcal{T}_{+,-}^G$ | Growth duration (plus/minus MT ends) | s. | |
| $\mathcal{T}_{+,-}^S$ | Shrinkage duration (plus/minus MT ends) | s. | |
| $\mathcal{T}_{+,-}^P$ | Pause duration (plus/minus MT ends) | s. | |
| $X_{+,-}^{Seed}$ | Position of the plus/minus seed end | μm | |

| Parameter | Definition | Units | Value |
|------------------|---|---------------------------------|----------------------|
| V_+^G | Growth rate, (+) end | $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ | 2.6×10^{-2} |
| V_-^G | Growth rate, (-) end | $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ | 8.8×10^{-3} |
| V_+^S | Shrinkage rate, (+) end | $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ | 2.4×10^{-1} |
| V_-^S | Shrinkage rate, (-) end | $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ | 6.7×10^{-1} |
| τ_+^G | Average duration, growth phase, (+) end. | s. | 210 |
| τ_+^S | Average duration, shrinkage phase, (+) end. | s. | 28 |
| τ_+^P | Average duration, pause phase, (+) end. | s. | 0 |
| τ_-^G | Average duration, growth phase, (-) end. | s. | 280 |
| τ_-^S | Average duration, shrinkage phase, (-) end. | s. | 15 |
| τ_-^P | Average duration, pause phase, (-) end. | s. | 110 |

Table S2. Matrix Transition.

| | G | S | P | ← After transition |
|----------|------------|------------|------------|--------------------|
| G | G→G | G→S | G→P | |
| S | S→G | S→S | S→P | |
| P | P→G | P→S | P→P | |

↑
Before transition

$$P_{-} = \begin{pmatrix} 0 & 0.95 & 0.05 \\ 0.78 & 0 & 0.22 \\ 1 & 0 & 0 \end{pmatrix}, P_{+} = \begin{pmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 0.45 & 0 & 0.55 \\ 1 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

Letters G, S, P (as for growing 'G', shrinking 'S' or pausing 'P'), indicate, respectively, the status of the MT end before (left column) and after (top row) the transition. The intersection of a row and a column gives the probability to make a transition between two MT states as indicated (top row). Left and right matrixes (bottom row) give the values used in simulation for, respectively, the (-) and the (+) end.

Table S3. List of parameters used in interactions between MAPs and MTs.

| Parameter | Definition | Unit | Value |
|------------------|--|--|-----------------------------------|
| [MAP] | MAP concentration | μM | $0.1 \leq [\text{MAP}] \leq 1.25$ |
| nMT | Number of MTs in a bundle | - | $2 \geq nMT \geq 15$ |
| k_{on} | MAP65-1/4 binding constant, parallel MTs case. | $\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ | 10^{-2} |
| k_{off} | MAP65-1/4 dissociation constant | s^{-1} | 0 |
| l | Maximal MAP linear density | μm^{-1} | 100 |
| pR_p | Probability to remove a MAP65 connecting parallel MTs during shrinkage. | - | $0 \leq pR_p \leq 1$ |
| pR_{ap} | Probability to remove a MAP65 connecting anti-parallel MTs during shrinkage. | - | $0 \geq pR_{ap} \geq 1$ |

SUPPORTING FIGURES AND MOVIES

Figure S1. Dynamic parameters of individual MTs in the presence of MAP65-1.

(A). Distribution of MT elongation rates for individual MTs (top panel) or within bundles in the presence of 0.5 μM MAP65-1 (middle panel) and 1.25 μM MAP65-1 (bottom panel). Data for MT (-) and (+) ends are shown in green and blue respectively. Average rates and population size are indicated. **(B).** Distribution of MT shortening rates for individual MTs (top panel) or within bundles in the presence of 0.5 μM MAP65-1 (middle panel) and 1.25 μM MAP65-1 (bottom panel). Data for MT (-) and (+) ends are shown in green and blue respectively. Average rates and population size are indicated. Note that in bundles, the density of MTs impaired the reliable detection of (+/-) MT ends depolymerization events; both ends are shown with the same color (middle and bottom panels). In particular, (-) ends were often embedded in complex kymographs, and were underrepresented in the statistical data used in the analysis, as reported shortening rates correspond mainly to MT (+) ends. **(C).** Duration of MT elongation over time in the absence and in the presence of MAP65-1. **(D).** Amplitude of MT depolymerization length over time, in the absence or in the presence of MAP65-1.

Figure S2. Dynamics of MTs bundled with MAP65-4. (A).

Kymographs of MT bundles in the presence of GFP-MAP65-4. **(B).** Distribution of MT elongation rates for individual MTs (top panel) or within bundles in the presence of 0.25 μM MAP65-4 (middle panel) and 0.5 μM MAP65-4 (bottom panel). Data for MT (-) and (+) ends are shown in green and blue respectively. Average rates and population size are indicated. **(C).** Distribution of MT shortening rates for individual MTs (top panel) or within bundles in the presence of 0.25 μM MAP65-4 (middle panel) and 0.5 μM MAP65-4 (bottom panel). Average rates and population size are indicated. Data for MT (-) and (+) ends are shown in green and blue respectively. As in Figure S1, we could not reliably distinguish (+) and (-) ends depolymerization events in dense bundles, and both ends are shown with the same color (middle and bottom panels). **(D).** Length history plot of 3 single MTs in the absence of MAP65-4 (top panel) and 3 MT bundles in the presence of MAP65-4 (middle and bottom panels). **(E).** Duration of growth phases after a rescue event as a function of MAP65-4 concentration. Dark dots indicate mean values. **(F).** Depolymerization length of MTs in the presence of

MAP65-4. **(G)**. Duration of MT elongation over time in the absence and in the presence of MAP65-4. **(H)**. Variation of MT depolymerization length over time, in the absence or in the presence of M65-4.

Figure S3. Dynamics of individual MTs in the presence of 50 nM MAP65-1. (A). Kymographs of a single MT that elongates in the absence (left) and in the presence of 50 nM of GFP-MAP65-1 (right). Kymograph is the merge image of Alexa-568 MT (red) elongating from an alexa-568 MT seed (red) in the presence of GFP-MAP65-1 (green). Thus the yellow color reveals the binding of GFP-MAP65-1 on the MT. Schemes on top of the kymographs show the orientation of MT ends. Bottom images show the MT used to draw the kymographs. **(B)**. Length history plot of 3 single MTs in the absence and in the presence of 50 nM MAP65-1. **(C-D)**. Distribution of elongation rates (C) and shortening rates (D) of single MTs in the absence (left column) or in the presence of 50 nM MAP65-1 (right column). Data for MT (-) and (+) ends are shown in blue and green respectively. Average rates and population size are indicated. **(E)**. Duration of elongation of single MTs after a rescue event in the absence and in the presence of 50 nM MAP65-1. Dark dots indicate mean values. **(F-G)**. Depolymerization length of MT minus ends (F) and plus ends (G) in the absence and in the presence of 50 nM MAP65-1.

Figure S4. Dynamic parameters of individual MTs in the absence of MAP65. Distribution of the duration of MT elongation **(A)**, the duration of MT shrinkage **(B)** and the duration of MT pause **(C)**. Data for MT plus and minus ends are shown in blue and green respectively. Population size (N), mean value (m) and standard error (SE) are indicated.

Figure S5. Binding of MAP65-1 to parallel MTs. (A). Examples of calculated MT maximal length at $t=20$ min, expressed as a function of pR_p (removal probability for MAP65-1 connecting parallel MTs) and the number of MTs. Simulations were repeated for different values of pR_{ap} and for a MAP65-1 concentration of $0.5 \mu\text{M}$. **(B-C)**. Optimal value for pR_p as a function of the number of MTs in the bundle. We determined these values for different removal probability for MAP65-1 connecting anti-parallel MTs (pR_{ap}) (B) or various MAP65-1 concentrations (C). Both panels show that pR_p is in the range 0.9-1 and is independent of pR_{ap} and MAP65-1

concentration. **(D)**. Binding of MAP65-1 (b) to parallel MTs (a) nucleated by axonema (arrowhead). (c) is the merge image of (a) and (b). (d) Kymograph of a MT bundle as in (b). All MT elongation rates are similar (plain lines), showing that MTs are parallel. (e) MTs nucleated from an axonema in the absence of MAP65-1. MTs split apart from the axonema.

Figure S6. Model simulations and comparison with experiments. The model used in this study depends on kinetic parameters (k_{on} , k_{off}) of MAP65 binding, MAP65 concentrations $[MAP65]$, number of MTs in the bundle and probability factors, pR_{ap} and pR_p , that govern the MAP65 dynamics during MT depolymerization. Of all these parameters, only (k_{on} , k_{off}) and the MAP65 concentrations are known. We determined the probability factors and the number of MTs that give the best fit with the experiments using the following algorithm:

1. Using a couple of parameters values (p_1 , p_2), we simulated a series of 10 independent kymographs.
2. Then, for each simulated kymograph, we compute, Δ , the distance between the model and the experiment by summing up the difference between the predicted bundle length ($L_M(t)$) and the measured length ($L_E(t)$) for all available time points in both the simulated and experimental kymographs.
3. We code the value of the Δ so that the best match ($\Delta=0$ or minimum) is dark blue and the worst match is bright red.
4. We color the pixel at position (p_1 , p_2) using the color corresponding to the value of Δ .
5. We repeat the procedure for all pixels in the parameter plane.

The parameter combination given the best model-experimental match is directly read out from the position of the dark blue pixel(s) in the parameter plane.

Figure S7. Determination of the spatial domain accessible to MAP65 connections between two microtubules. (A). In the model, we limited our attention to MAP65 connecting MTs in the spatial domain limited by the position $X(i,j,1)$ (left point) and $X(i,j,2)$ (right point). The seed is indicated in red; tubulin in green. **(B)**. Computation of the limit positions $X(i,j,1)$ and $X(i,j,2)$ for parallel (top) or anti-parallel (bottom) MTs using formulae (12-15) in the supplemental text.

Movie S1. Movies of elongating MTs in the absence of MAP65 (0.2 fps).

Movie S2. Movies of elongating MT bundles in the presence of MAP65-1 (0.5 fps).

Movie S3. Movies of elongating MT bundles in the presence of MAP65-4 (0.2 fps).

Movie S4. Simulations of MT dynamics in the absence of MAP65 (0.1 fps). Top panel shows dynamic MTs undergoing rescues and catastrophes. MT seeds are in red, tubulin is in green; (+) and (-) indicate plus and minus MT ends respectively. Bottom. Kymographs of tubulin (left, green traces) are shown.

Movie S5. Simulations of MT dynamics in the presence of 0.25 μM MAP65-4 (0.1 fps). Top panel illustrates MT dynamics and the control of depolymerization by MAP65-4. MT seeds are in red, tubulin is in green. MAP65-4 bonds are symbolized by blue lines connecting the MTs. (+) and (-) indicate (+) and (-) MT ends respectively. On the bottom of the Figure, kymographs of tubulin (left, green traces) and MAP65-4 (right, blue traces) are shown. The MAP65-4 binding wave is coded by the intensity of the blue color used to represents bonds (Top panel) or MAP65-4 kymographs (bottom right panel).

Movie S6. Simulations of MT dynamics in the presence of 1 μM MAP65-1 (0.1 fps). On top are shown dynamic MTs that undergo rescues and catastrophes. MT seeds are in red, tubulin is in green. MAP65-1 bonds are shown in blue. (+) and (-) indicate plus and minus MT ends respectively. On the bottom of the Figure, kymographs of tubulin (left, green traces) and MAP65-1 (right, blue traces) are shown. Same code color for the MAP65-1 binding wave as in Movie S6.

Figure S1

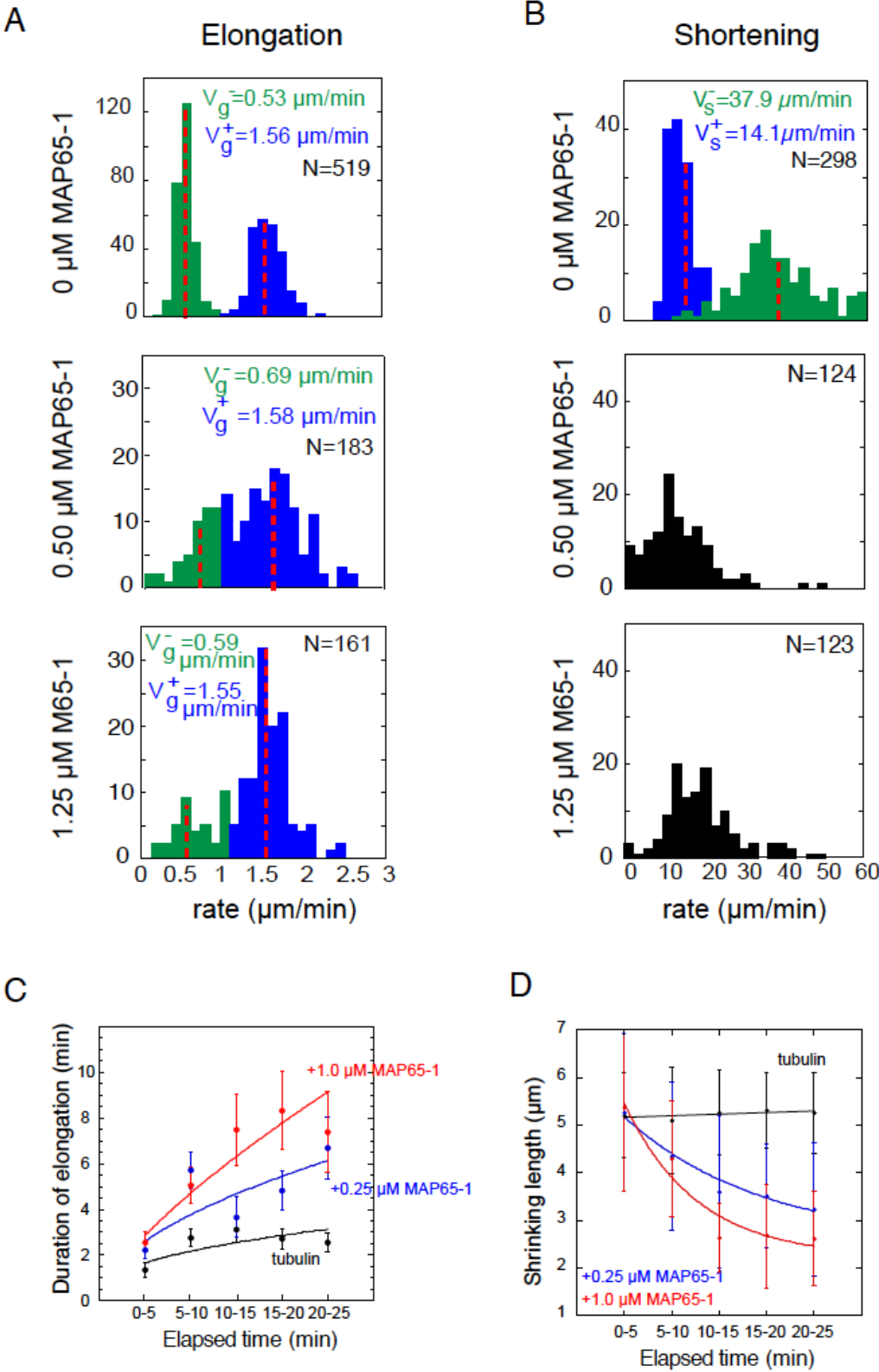


Figure S2

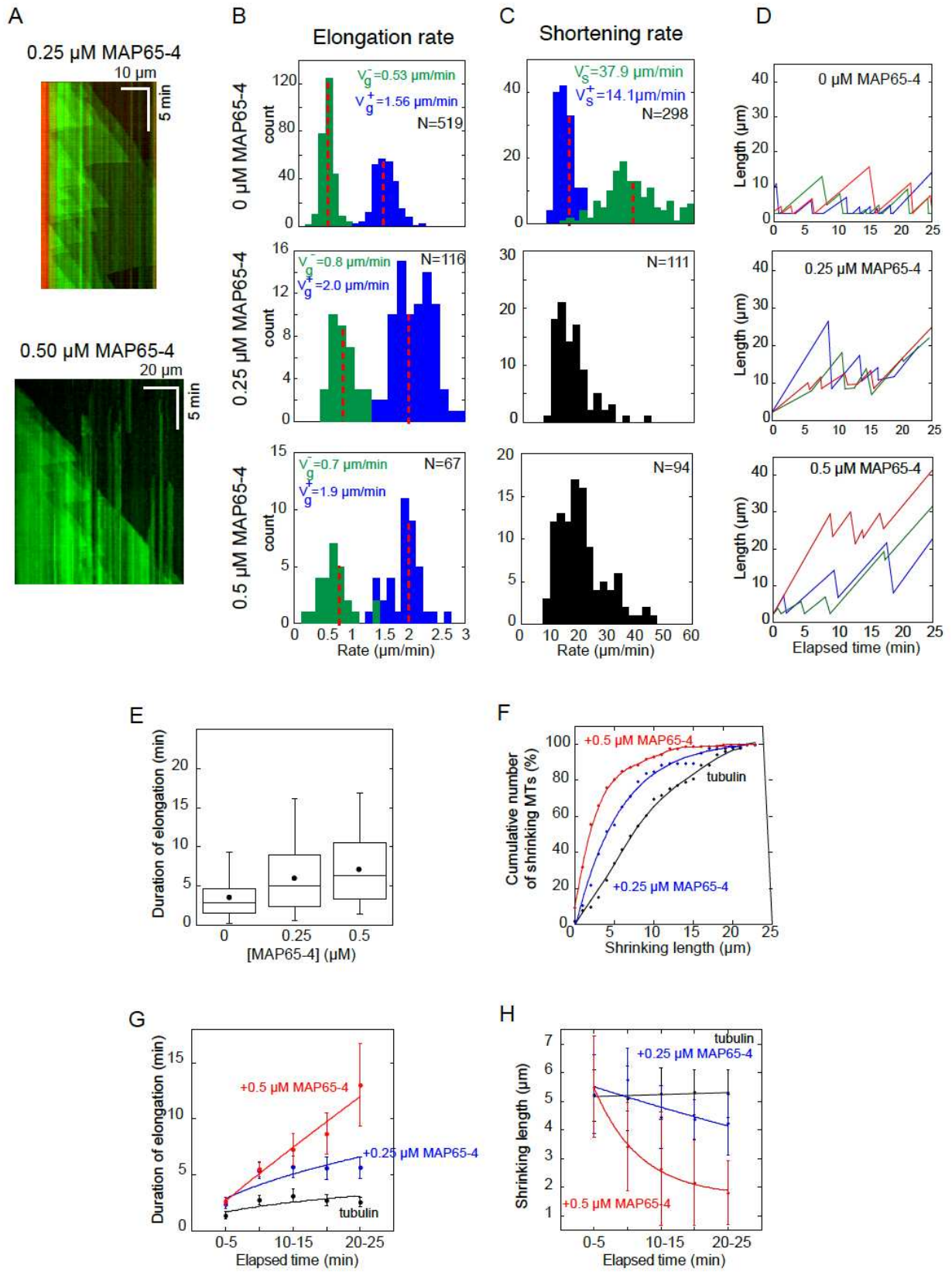


Figure S3

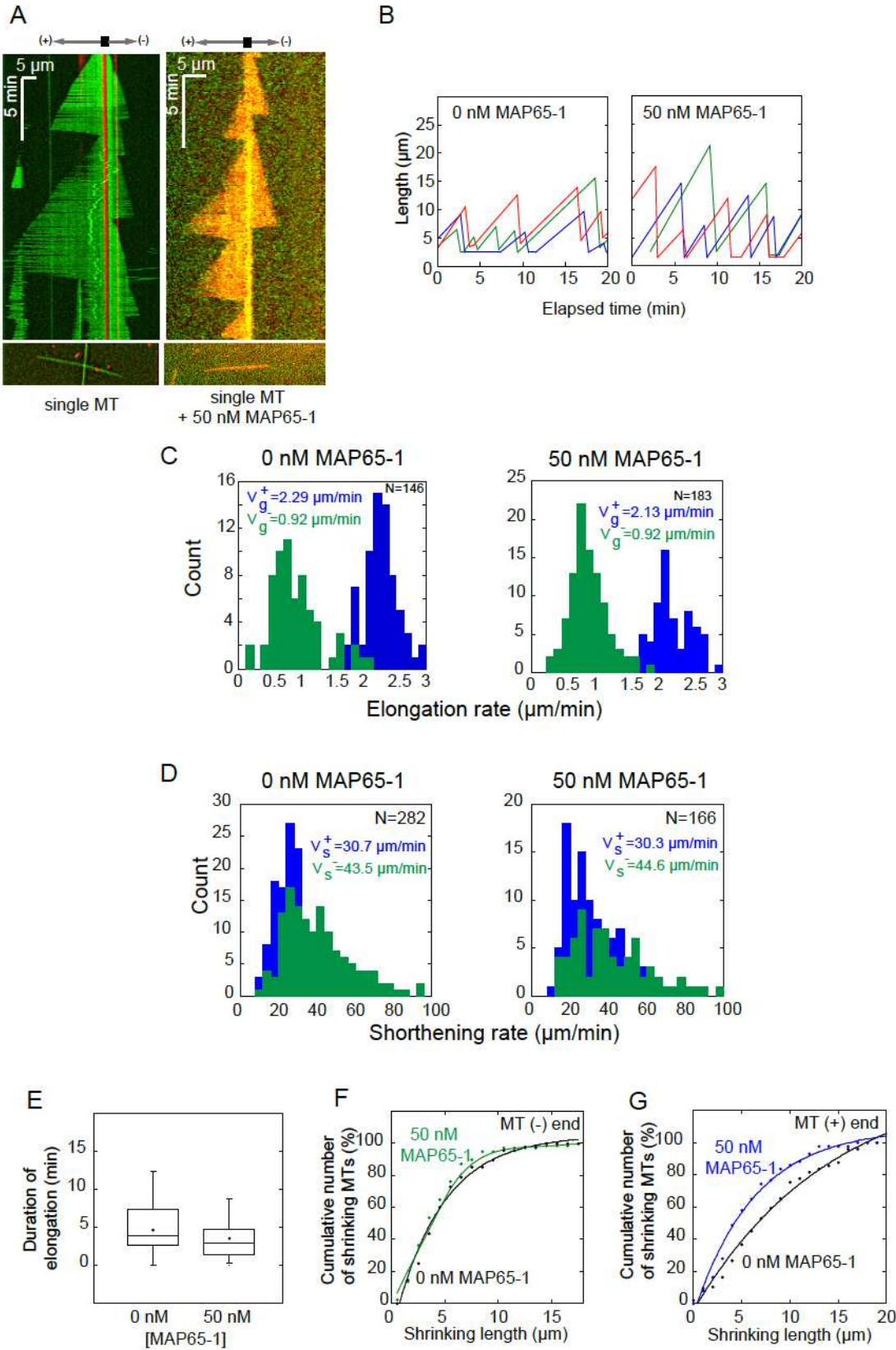
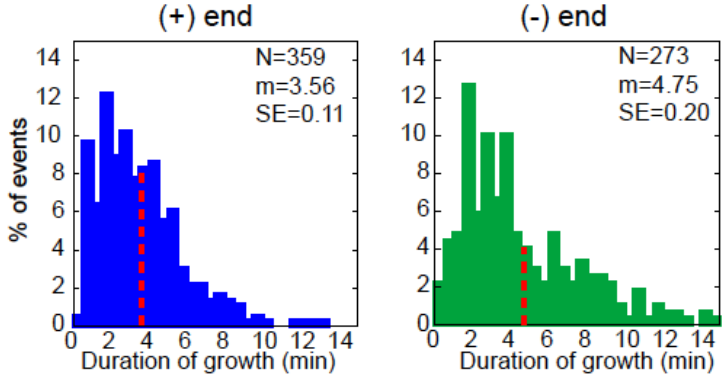
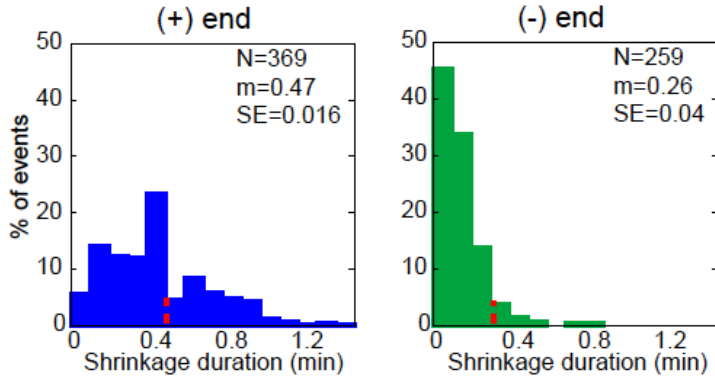


Figure S4

A Growth duration



B Shrinkage duration



C. Pause duration

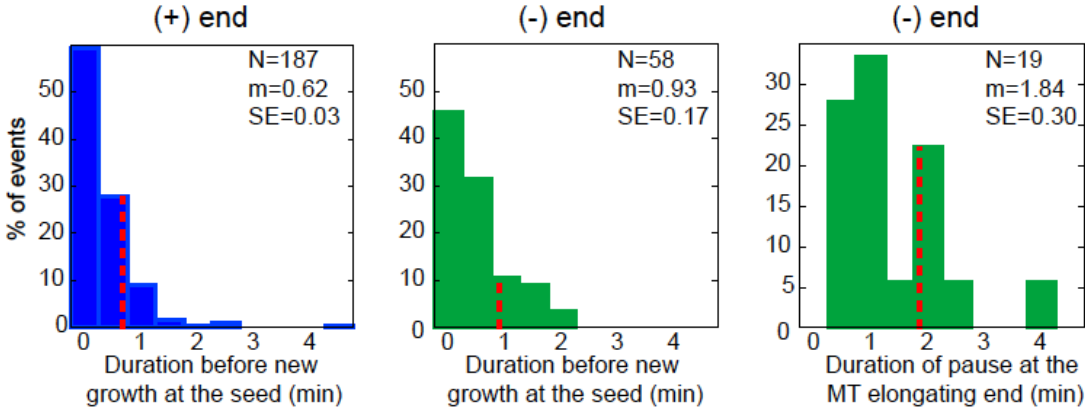


Figure S5

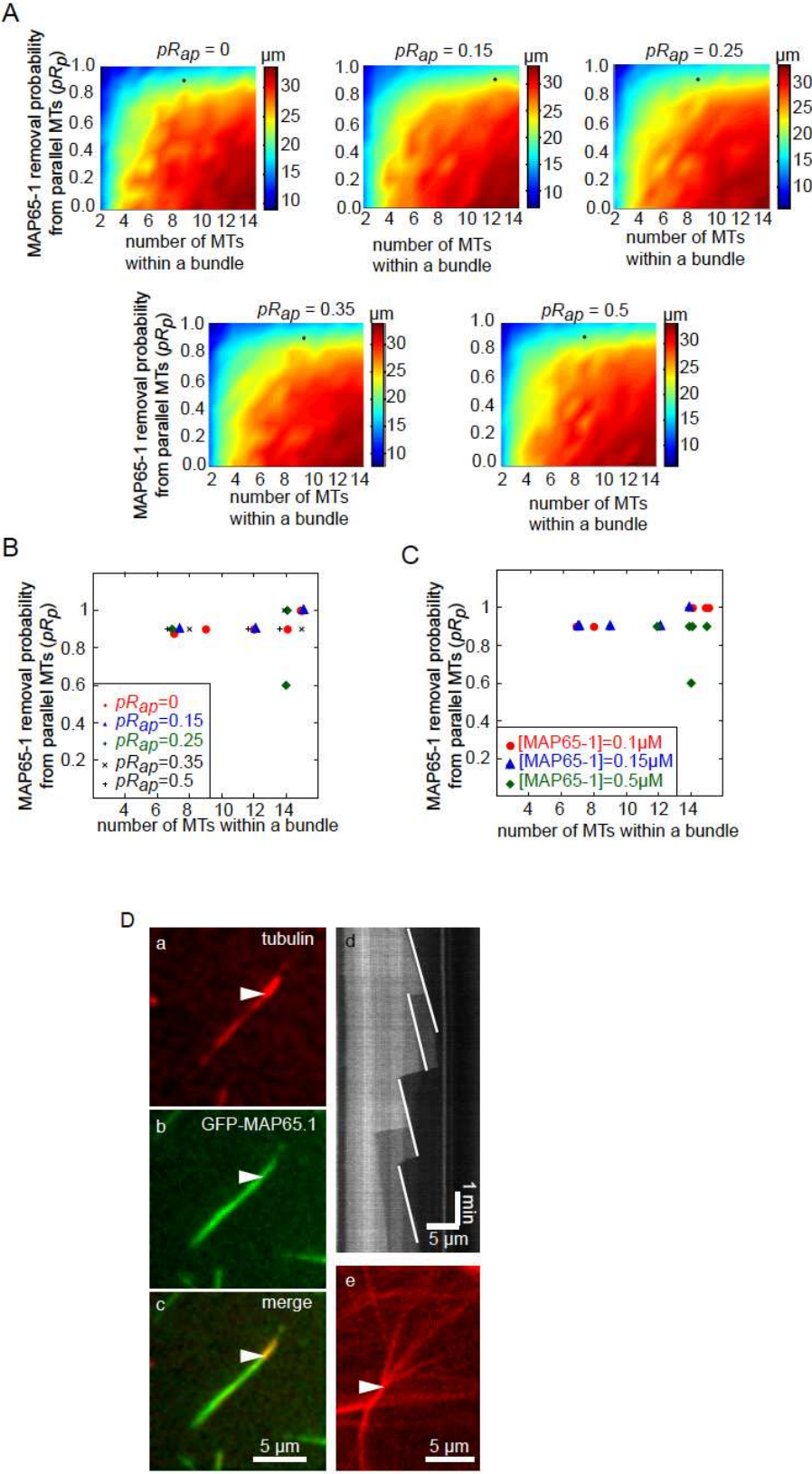


Figure S6

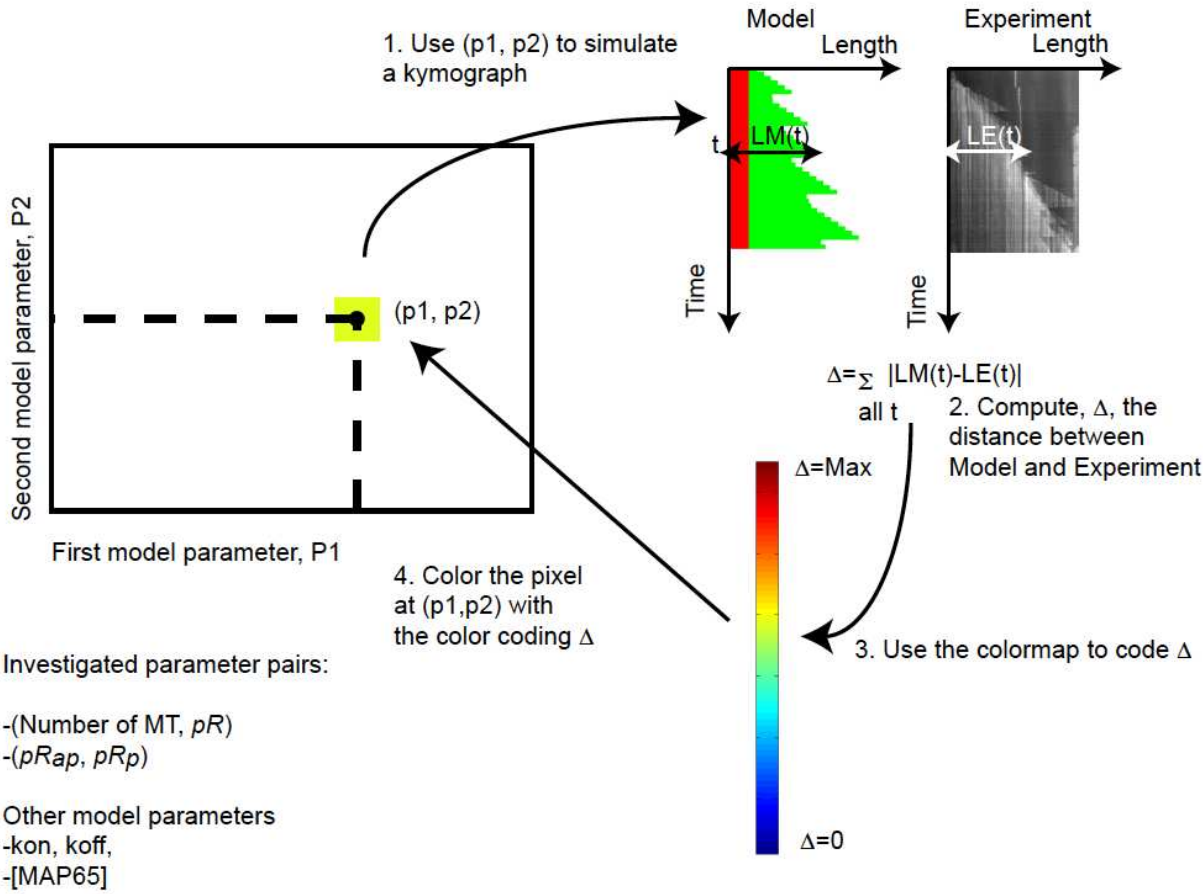
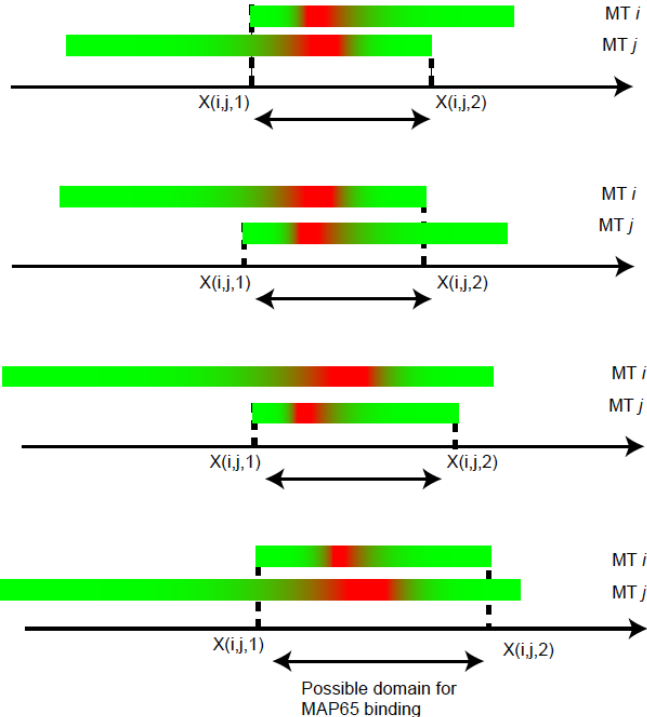
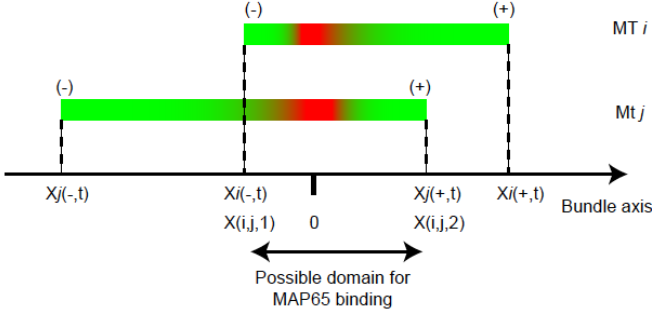


Figure S7

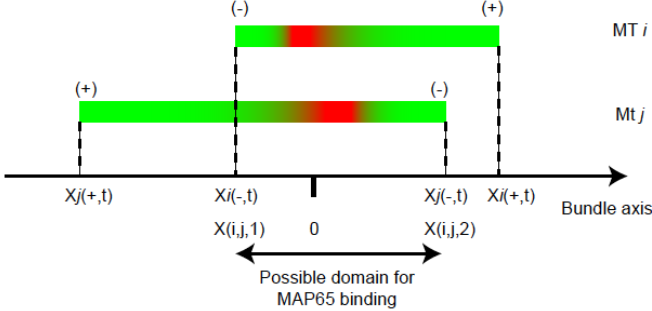
A Possible MT-MT configurations



B Parallel MTs



Anti-parallel MTs



Résumé

Le cytosquelette de microtubule (MT) est essentiel dans de nombreux processus cellulaires tels que le trafic intracellulaire, la division cellulaire, la modification et le maintien de la forme de la cellule. En fonction du type cellulaire ou de son état de différenciation, les réseaux de MTs vont adopter des architectures différentes. Ces organisations sont définies par des contraintes géométriques intracellulaires et l'activité moléculaire de nombreuses protéines associées aux MTs (MAPs). Parmi ces protéines, des membres de la famille des MAP65s ont été identifiés. *In vitro*, elles forment des ponts entre les MTs pour les organiser en faisceaux.

Le but de mon travail de thèse a été d'étudier *in vitro* le rôle de MAP65s dans l'auto-organisation d'un réseau de faisceaux de MTs. Dans un premier temps, j'ai mis au point un système biomimétique utilisant la technique de « micro-patterning » qui impose une géométrie d'assemblage pour les MTs dans des limites qui se rapprochent de celles observées dans les cellules. Cette méthode permet de contrôler précisément l'assemblage des MTs à partir de zones dont les formes, la taille et la distribution des unes par rapport aux autres sont définies. Pour valider cette technique, j'ai reconstitué des réseaux qui miment des architectures cellulaires (i.e modules du fuseau mitotique). Dans un deuxième temps, j'ai étudié le rôle de MAP65s dans l'auto-organisation de réseaux de faisceaux de MTs, et plus particulièrement l'étape de co-alignement entre MTs dynamiques et dispersés. J'ai montré que MAP65-1 de plante et son orthologue chez la levure, Ase1, diminuent fortement la longueur de persistance de MTs isolés ou organisés en faisceaux. Cet assouplissement leur permet de se déformer et donc de se co-aligner pour former des faisceaux lorsqu'ils se rencontrent à des angles de rencontre élevés. L'augmentation de flexibilité est due à l'interaction du domaine de liaison de MAP65-1/Ase1 avec la lattice des MTs. Ces résultats suggèrent que la diminution de la rigidité des MTs contrôle l'issue des événements des rencontres entre MTs dans les cellules. De façon plus générale, la modulation des propriétés mécaniques des MTs par des MAPs représente un nouveau mécanisme pour réguler la plasticité des réseaux de MTs dans les cellules eucaryotes.

Abstract

The microtubule (MT) cytoskeleton is essential for many cell processes, such as the intracellular trafficking, the cell division, and the cell morphogenesis. Depending on the cell type or on its differentiation state, the MT networks will adopt different architectures. These organizations are defined by intracellular geometric constraints and the regulation of the activity of many MT associated proteins (MAPs). Among these proteins, we get a particular interest in MAP65s family that crosslink MTs to organize them into bundles.

The aim of my thesis was to study *in vitro* the role of MAP65s in the self-organization of MT bundles in particular networks. As a first step, I developed a biomimetic system using the micro-patterning procedure which imposes a MT assembly geometry within limits close to those observed in cells. This method allows to precisely control the MT assembly from micro-patterns with define shape, size and spatial distribution. In order to validate this technic, I reconstituted MT networks which mimic cellular architecture (i.e mitotic spindle modules). In a second time, I studied the role of major MT cross-linkers that are members of the MAP65 family in the formation of MT bundles, particularly the step of MT co-alignement after encountering of dynamic growing MTs. I found that plant MAP65-1 and its yeast ortholog, Ase1, lower the global rigidity of single MTs and MT bundles. This increase in MT flexibility is directly caused by interactions between the MAP65 MT-binding domain and the MT lattice. These data suggest that MT softening by MAP65 controls the issue of MT encounters, so that self-organized ordered MT bundles are formed in living cells. In a more general way, the modulation of MT mechanical properties by MAPs represent a new mechanism to regulate MT networks plasticity in eukaryote cells.

Résumé

Le cytosquelette de microtubule (MT) est essentiel dans de nombreux processus cellulaires tels que le trafic intracellulaire, la division cellulaire, la modification et le maintien de la forme de la cellule. En fonction du type cellulaire ou de son état de différenciation, les réseaux de MTs vont adopter des architectures différentes. Ces organisations sont définies par des contraintes géométriques intracellulaires et l'activité moléculaire de nombreuses protéines associées aux MTs (MAPs). Parmi ces protéines, des membres de la famille des MAP65s ont été identifiés. *In vitro*, elles forment des ponts entre les MTs pour les organiser en faisceaux.

Le but de mon travail de thèse a été d'étudier *in vitro* le rôle de MAP65s dans l'auto-organisation d'un réseau de faisceaux de MTs. Dans un premier temps, j'ai mis au point un système biomimétique utilisant la technique de « micro-patterning » qui impose une géométrie d'assemblage pour les MTs dans des limites qui se rapprochent de celles observées dans les cellules. Cette méthode permet de contrôler précisément l'assemblage des MTs à partir de zones dont les formes, la taille et la distribution des unes par rapport aux autres sont définies. Pour valider cette technique, j'ai reconstitué des réseaux qui miment des architectures cellulaires (i.e modules du fuseau mitotique). Dans un deuxième temps, j'ai étudié le rôle de MAP65s dans l'auto-organisation de réseaux de faisceaux de MTs, et plus particulièrement l'étape de co-alignement entre MTs dynamiques et dispersés. J'ai montré que MAP65-1 de plante et son orthologue chez la levure, Ase1, diminuent fortement la longueur de persistance de MTs isolés ou organisés en faisceaux. Cet assouplissement leur permet de se déformer et donc de se co-aligner pour former des faisceaux lorsqu'ils se rencontrent à des angles de rencontre élevés. L'augmentation de flexibilité est due à l'interaction du domaine de liaison de MAP65-1/Ase1 avec la lattice des MTs. Ces résultats suggèrent que la diminution de la rigidité des MTs contrôle l'issue des événements des rencontres entre MTs dans les cellules. De façon plus générale, la modulation des propriétés mécaniques des MTs par des MAPs représente un nouveau mécanisme pour réguler la plasticité des réseaux de MTs dans les cellules eucaryotes.

Abstract

The microtubule (MT) cytoskeleton is essential for many cell processes, such as the intracellular trafficking, the cell division, and the cell morphogenesis. Depending on the cell type or on its differentiation state, the MT networks will adopt different architectures. These organizations are defined by intracellular geometric constraints and the regulation of the activity of many MT associated proteins (MAPs). Among these proteins, we get a particular interest in MAP65s family that crosslink MTs to organize them into bundles.

The aim of my thesis was to study *in vitro* the role of MAP65s in the self-organization of MT bundles in particular networks. As a first step, I developed a biomimetic system using the micro-patterning procedure which imposes a MT assembly geometry within limits close to those observed in cells. This method allows to precisely control the MT assembly from micro-patterns with define shape, size and spatial distribution. In order to validate this technic, I reconstituted MT networks which mimic cellular architecture (i.e mitotic spindle modules). In a second time, I studied the role of major MT cross-linkers that are members of the MAP65 family in the formation of MT bundles, particularly the step of MT co-alignment after encountering of dynamic growing MTs. I found that plant MAP65-1 and its yeast ortholog, Ase1, lower the global rigidity of single MTs and MT bundles. This increase in MT flexibility is directly caused by interactions between the MAP65 MT-binding domain and the MT lattice. These data suggest that MT softening by MAP65 controls the issue of MT encounters, so that self-organized ordered MT bundles are formed in living cells. In a more general way, the modulation of MT mechanical properties by MAPs represent a new mechanism to regulate MT networks plasticity in eukaryote cells.