



HAL
open science

Organisation du réseau cortical de microtubules chez *Arabidopsis thaliana* : contribution des protéines EB1 et MAP65-1

Arthur Molines

► **To cite this version:**

Arthur Molines. Organisation du réseau cortical de microtubules chez *Arabidopsis thaliana* : contribution des protéines EB1 et MAP65-1. Biologie cellulaire. Université Paris Saclay (COMUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLS421 . tel-01446716

HAL Id: tel-01446716

<https://theses.hal.science/tel-01446716>

Submitted on 26 Jan 2017

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.

NNT : 2016SACLS421

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

Ecole Doctorale n°567
Sciences du Végétal : du gène à l'écosystème

Doctorat de Biologie

Par
M. Arthur Molines

Organisation du Réseau Cortical de Microtubules chez *Arabidopsis thaliana* :
Contribution des protéines EB1 et MAP65-1

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 15 novembre 2016.

Composition du jury :

Mme Annie Andrieux	Directrice de Recherche, CEA	Rapporteur
M. Olivier Hamant	Directeur de Recherche, INRA	Rapporteur
Mme Marianne Delarue	Professeur des Universités, UPSUD	Président du jury
M. Franck Perez	Directeur de Recherche, CNRS	Examineur
Mme Magalie Uyttewaal	Chargée de Recherche, INRA	Examineur
M. Frédéric Coquelle	Maître de Conférences, UPSUD	Directeur de thèse

Remerciements

Tout d'abord, ce petit mot à tous ceux qui liront ces lignes et chercheront leur nom sans le trouver, je vous présente toutes mes excuses et vous remercie anonymement ici : Merci à vous.

En premier lieu je remercie Annie Andrieux, Marianne Delarue, Olivier Hamant, Magalie Uyttewaal et Franck Perez pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, en particulier Annie Andrieux et Olivier Hamant pour leur lecture attentive de ce travail en tant que rapporteurs. Je remercie également les membres de mon comité de thèse, pour leurs conseils tout au long de la réalisation de ce projet : Yves Dessaux, Martine Pastuglia, Christian Poüs et Grégory Vert.

Je tiens évidemment à remercier en tout premier lieu Béatrice Satiat-Jeunemaître et Frédéric Coquelle. La première pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail de thèse au sein de son équipe, le second pour la qualité de son encadrement. Un proverbe veut que les contraires s'attirent, je ne sais pas si c'est vrai pour les gens, mais il faut avouer que Frédéric et moi avons et avons toujours des façons de faire différentes. Mais ces différences ont donné lieu à des discussions constructives plutôt que destructives, et nous ont permis de mener à bien ce projet de thèse avec des points de vue différents mais complémentaires. Je tiens également à remercier Frédéric pour l'autonomie et la confiance qu'il a su m'accorder tout au long de ce projet et que j'espère ne jamais avoir déçues.

Je remercie chaleureusement tous les membres passés et présents de l'équipe que j'ai pu côtoyer : Sebastien Bellow, Laetitia Besse, Michele Bianchi, Claire Boulogne, Mickael Bourge, Spencer Brown, Jim Dompierre, Cynthia Dupas, Cynhtia Gillet, Mario Gomez-Pacheco, Romain Le Bars, Jessica Marion, Marie-Noëlle Soler et Mébarek Temagout. Tous, en plus d'avoir pu contribuer à ce travail de thèse par des discussions, ont permis de faire de ces bientôt 4 années un moment agréable notamment grâce aux blagues, plus ou moins recherchées, et aux bières échangées en fin de journée dès que l'occasion se présentait (et elle se présentait souvent !). Je veux remercier particulièrement Jim Dompierre qui m'a appris à dompter les microscopes et a vu avant moi certains des phénotypes décrits dans ce travail ; Jessica Marion qui a été d'une aide précieuse tout au long du projet et bien sûr Michele

Bianchi qui en plus de sa grande disponibilité a su répondre avec entrain à toutes mes questions. Je tiens également à remercier Michele pour son amour des « pickles » et pour tous ces instants partagés, ces moments privilégiés ayant permis de faire germer des idées parfois brillantes (mais pas toujours).

Ce travail de thèse ne serait pas ce qu'il est sans les conseils et discussions provenant des collègues avec qui nous avons partagé les couloirs et les bureaux. En particulier le personnel des équipes de Sébastien Thomine et de Gregory Vert : Alexis De Angeli, Amanda Barranco, Anne Cayrel, Elsa Demes-Causse, Guillaume Dubeaux, Christelle Espagne, Sophie Filleur, Jean-Marie Frachisse, Jérôme Giraudat, Marjorie Guichard, Julie Hodin, Vivane Marie, Sara Martins, Sylvain Merlot, Julie Neuveu, Catherine Primard-Brisset, Vanessa Sanchez Garcia de la Torre, Daniel Tran et Enric Zelazny. Je tiens spécialement à remercier Jean-Marie, Sylvain, Sébastien et Grégory pour leur disponibilité. Je remercie également Guillaume Dubeaux qui connaît en même temps que moi les affres de l'état de thésard, pour sa générosité et sa bonne humeur. Je remercie également les collègues d'autres instituts qui grâce à leurs discussions, leurs conseils ou du matériel, ont contribué à ma formation et à faire avancer ce projet : Jean-Denis Faure, Olivier Hamant, Samantha Vernhettes, Jacques Montagne, Daan Noordermeer, Jean-Christophe Palauqui, Martine Pastuglia, Catherine Perrot-Rechenmann, Laurie Grandont, Sébastien Paque.

Un grand merci à nos collaborateurs : Isabelle Arnal, Atef Asnacios, Salem Chabout, Grégory Mouille, Virginie Stoppin-Mellet et Marylin Vantard.

Je tiens à remercier tous les autres étudiants et doctorants de l'institut pour les bons moments passés ensemble lors des repas « non-permanents » du lundi midi ou des apéros organisés par l'association « Your-I2BC », dont je remercie au passage les membres pour leurs efforts dans l'organisation d'évènements favorisant la rencontre des étudiants de tout l'institut.

Un grand merci également à l'ensemble des services communs, notamment à Guillaume Lucas et Véronique Couvreur du service culture pour les soins permanents apportées à mes plantes, mais également à Christine Oullion et François Meininger pour leur disponibilité et leur réactivité.

Enfin je tiens à remercier ma famille pour son soutien permanent et particulièrement Audrey Seigneur pour sa compagnie pendant toutes ces années et pour avoir su me faire décompresser quand c'était nécessaire.

Liste des abréviations

ADN	<u>A</u> cide <u>D</u> éoxyribo <u>n</u> ucléique
ADNt	<u>A</u> cide <u>D</u> éoxyribo <u>n</u> ucléique de <u>t</u> ransfert
APC	<u>A</u> denous <u>P</u> olyposis <u>C</u> oli
ASE1	<u>A</u> naphase <u>S</u> pindle <u>E</u> longation 1
Bim1	<u>B</u> inding to <u>M</u> icrotubule 1
BY-2	cultivar <u>B</u> right <u>Y</u> ellow 2
C-ter	<u>C</u> arboxy terminale
CLASP	<u>C</u> ytoplasmic <u>L</u> inker <u>A</u> ssociated <u>P</u> rotein 1
Col-0	<u>C</u> olumbia-0 ecotype
COMT	<u>C</u> entre <u>O</u> rganisateur de <u>M</u> icrotubules
EB1	<u>E</u> nd <u>B</u> inding protein 1
EBH	<u>E</u> nd <u>B</u> inding <u>H</u> omology
FA	<u>F</u> ilament d'actine
FT-IR	<u>F</u> ourier <u>T</u> ransform <u>I</u> nfra <u>R</u> ed spectroscopy
GFP	<u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein
GMPCPP	<u>G</u> uanlyl-(alpha, beta)- <u>M</u> ethylene-diphosphate
IPTG	<u>I</u> sopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
Kif2	<u>K</u> inesin-like protein 2
MAP65-1	<u>M</u> icrotubule <u>A</u> ssociated <u>P</u> rotein 65 isoform 1
MBD	<u>M</u> icrotubule <u>B</u> inding <u>D</u> omain
MCAK	<u>M</u> itogen <u>C</u> entromer- <u>A</u> ssociated <u>K</u> inesin
mCherry	<u>M</u> onomeric <u>C</u> herry fluorescent protein
Msp	<u>M</u> ini spindles
MOR1	<u>M</u> icrotubule <u>O</u> rganization 1
MPK4	<u>M</u> itogen-activated <u>P</u> rotein <u>K</u> inase 4
MT	<u>M</u> icrotubule
NLS	<u>N</u> uclear <u>L</u> ocalisation <u>S</u> ignal
N-ter	Amino terminale
Op18	<u>O</u> ncoprotein 18
PRC1	<u>P</u> rotein <u>R</u> egulator of <u>C</u> ytokinesis 1
RE	<u>R</u> éticulum <u>E</u> ndoplasmique
SDS-PAGE	<u>S</u> odium- <u>D</u> odecyl- <u>S</u> ulfate <u>P</u> olyacrylamide <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis
STED	<u>S</u> timulated <u>E</u> mission <u>D</u> epletion
STIM1	<u>S</u> tromal <u>I</u> nteraction <u>P</u> rotein 1
SIM	<u>S</u> tructural <u>I</u> llumination <u>m</u> icroscopy
XKCM1	<u>X</u> enopus <u>K</u> inesin <u>C</u> entral <u>M</u> otor 1
XMAP215	<u>X</u> enopus <u>M</u> icrotubule <u>A</u> ssembly <u>P</u> rotein of 215 kDa
WS	<u>W</u> assilewskija ecotype
+TIP	<u>M</u> icrotubule plus-end <u>t</u> racking proteins

Table des matières

Avant-propos.....	1
Introduction.....	3
I. Le cytosquelette	3
1) Le cytosquelette, quelques généralités.....	3
a) Les acteurs principaux	3
i. Les microfilaments d'actine.....	3
ii. Les filaments intermédiaires	7
iii. Les microtubules	10
iv. Les septines	12
b) Conservations des séquences et cytosquelettes procaryotes	14
c) Fonctions généralement associées au cytosquelette chez les eucaryotes	19
i. Organisation du cytoplasme et trafic intracellulaire	19
ii. Propriétés mécaniques et rôle morphogénétique du cytosquelette.....	21
iii. Rôle dans la morphodynamique des compartiments membranaires.....	22
iv. Rôle dans l'établissement des propriétés mécaniques des cellules	24
2) Les propriétés architecturales et dynamiques des microtubules.	27
a) Structure – Organisation moléculaire	27
b) L'instabilité dynamique	30
i. Une propriété intrinsèque des microtubules	30
ii. La coiffe GTP	31
iii. La coiffe conformationnelle	33
II. Les facteurs qui régulent l'instabilité dynamique et l'organisation du réseau de microtubules..	35
1) Un même filament, plusieurs organisations pour plusieurs fonctions	35
a) Tour d'horizon des différents types de réseaux rencontrés chez les eucaryotes.....	35
b) Le modèle « Search and Capture ».....	38
2) Les facteurs qui régulent la dynamique des microtubules.	40
a) Les MAP, généralités	40
b) Facteurs stabilisateurs et déstabilisateurs	41
III) Formation de faisceaux de microtubules : conséquences sur l'organisation des réseaux microtubulaires	51

1)	Organiser les microtubules en faisceaux.....	51
a)	Faire et maintenir un faisceau de microtubules	51
i.	Mécanismes généraux de formation des faisceaux de microtubules.....	51
ii.	Les protéines de pontage	54
b)	Conséquences de la formation des faisceaux	59
i.	Faisceaux et propriétés mécaniques	59
ii.	Faisceaux et instabilité dynamique	61
2)	Faisceaux et organisation du réseau	66
IV)	Le modèle d'étude, contexte et objectifs de la thèse	69
1)	Le modèle <i>Arabidopsis thaliana</i>	69
2)	Le contexte	70
3)	Les objectifs de la thèse	71
	Résultats	73
I)	Organisation du réseau de faisceaux de microtubules corticaux chez les mutants de EB1 et de MAP65-1.....	73
1)	Implication de EB1 dans l'organisation globale du réseau transverse.....	73
a)	Observations qualitatives.....	73
i.	Désorganisation partielle du réseau de microtubules dans les cellules de l'hypocotyle..	73
ii.	Désorganisation partielle du réseau de microtubules dans la racine	75
b)	Comment quantifier l'organisation du réseau ?	75
i.	Utilisation de l'espace de Fourier	75
ii.	Quantification basée sur l'anisotropie du réseau de microtubules	78
2)	Désorganisation de la paroi cellulaire chez le double mutant <i>eb1a-2 eb1b-3</i>	80
3)	Diminution du nombre de microtubules par faisceau en absence de AtEb1 a et AtEb1b.....	83
a)	Le STED, une méthode de super-résolution de choix pour des échantillons vivants	83
b)	Observations qualitatives.....	84
c)	Comment estimer le nombre de microtubules par faisceau ?.....	86
i.	Utilisation des distances intra et inter faisceaux.....	86
ii.	Utilisation de l'intensité du signal fluorescent pour estimer le nombre de microtubules par faisceau	88
d)	Estimation de l'occurrence des faisceaux chez les plantes contrôles et double mutant.....	90
4)	Désorganisation du réseau cortical et diminution du nombre de microtubules par faisceau en absence de MAP65-1.....	90

a)	Nombre de microtubules par faisceau.....	92
b)	Organisation des faisceaux en réseau.....	92
II)	Dynamique des microtubules et organisation du réseau.....	94
1)	Instabilité dynamique des microtubules chez le double mutant <i>eb1b-2 eb1b-3</i> et chez le mutant <i>map65-1</i>	94
2)	Instabilité dynamique et réorganisation du réseau cortical.....	96
III)	EB1 et hypersensibilité de la racine au toucher.....	100
IV)	Mise en évidence des propriétés intrinsèques de EB1.....	104
1)	Effet sur la dynamique des microtubules.....	106
2)	Effet sur la formation des faisceaux.....	106
V)	Exploration du rôle de EB1 dans l'organisation du réseau endomembranaire.....	110
	Discussion.....	115
1)	Limites du modèle.....	115
2)	Mécanismes d'organisation du réseau de microtubules.....	118
3)	Intégration multi-échelle des phénotypes : proposition d'un modèle de travail.....	123
4)	Des phénotypes faibles mais néanmoins intéressants.....	129
	Perspectives.....	131
	Matériel et méthodes.....	133
1)	Lignées et constructions.....	133
2)	Milieus de cultures.....	134
3)	Conditions de cultures.....	134
a)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	134
b)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	135
c)	<i>Escherichia coli</i>	135
4)	Conditions d'observations.....	135
a)	Plantules entières.....	135
b)	Microscopie.....	135
i.	Organisation du réseau cortical.....	136
ii.	Instabilité dynamique des microtubules.....	136
iii.	Super-résolution.....	136
iv.	Méristème apical racinaire.....	137

v.	Analyse de la paroi	137
vi.	Microscopie électronique.....	137
vii.	Expression transitoire.....	138
viii.	Système purifié.....	138
5)	Analyse d'image	139
a)	Organisation du réseau cortical	139
b)	Nombre de microtubules par faisceau.....	139
c)	Instabilité dynamique des microtubules.....	140
d)	Réorientation du réseau par l'auxine.....	141
e)	Déviaton de la racine.....	141
f)	Taille de la racine.....	141
6)	Analyse statistiques.....	141
a)	Organisation du réseau cortical	141
b)	Désorganisation de la paroi.....	142
c)	Nombre de microtubules par faisceau.....	142
d)	Instabilité dynamique.....	143
e)	Réorientation du réseau de microtubules par l'auxine.....	144
f)	Taille et déviation des racines en fonction de la dureté du milieu.	144
g)	Taille du méristème apical racinaire	144
7)	Purification de la protéine EB1b-6xHis.....	145
	Bibliographie.....	147
	Liste des annexes.....	157

Table des figures

Figure 1 : Organisation du cytosquelette.	4
Figure 2 : Structure et organisation des filaments d'actine.	4
Figure 3 : Polymérisation de l'actine soluble en filaments.	6
Figure 4 : Structure et organisation des filaments intermédiaires.	9
Figure 5 : Dynamique des filaments intermédiaires.	9
Figure 6 : Organisation et structure des microtubules.	11
Figure 7 : Septines et courbures de membranes.	13
Figure 8 : Filaments cytoplasmique procaryotes.	15
Figure 9 : Localisation des homologues bactériens de la tubuline.	17
Figure 10 : Le mouvement des mélanosomes dans le mélanophore est dépendant du cytosquelette	20
Figure 11 : Cytosquelette et déformation des membranes cellulaires.	23
Figure 12 : Organisation moléculaire d'un microtubule.	28
Figure 13 : Instabilité dynamique des microtubules.	32
Figure 14 : Organisation du réseau de microtubules pendant l'interphase et la division cellulaire chez les mammifères, les plantes supérieures et la levure <i>S. pombe</i>	37
Figure 15 : Mécanismes possibles d'associations des MAP et des +TIP avec les microtubules.	42
Figure 16 : Formation de faisceaux de microtubules.	53
Figure 17 : MAP65-1 est préférentiellement associée aux faisceaux de microtubules <i>in vivo</i>	56
Figure 18 : Rigidité des faisceaux de microtubules.	60
Figure 19 : La fermeture des stomates est corrélée avec la formation de faisceaux de microtubules dans les cellules de garde.	62
Figure 20 : Dynamique des microtubules dans un faisceau visualisé en SIM.	65
Figure 21 : La formation de faisceaux participe à l'organisation du réseau.	68
Figure 22 : Désorganisation du réseau cortical transverse de microtubule dans les cellules en élongation du double mutant <i>eb1a-2 eb1b-3</i>	74
Figure 23 : Quantification de l'organisation du réseau de microtubule fondée sur la transformée de Fourier.	77

Figure 24 : Anisotropie du réseau cortical de microtubules dans les cellules en élongation du double mutant <i>eb1a-2 eb1b-3</i>	79
Figure 25 : Spectres FT-IR de la paroi de l'hypocotyle de mutants de EB1.....	82
Figure 26 : Principe de la microscopie STED.....	85
Figure 27 : Le réseau de microtubule cortical du double mutant présente moins de faisceaux de microtubules.....	87
Figure 28 : Principe de la méthode de comptage du nombre de faisceaux.....	89
Figure 29 : Principe de la quantification du nombre de microtubules par faisceau fondée sur la mesure de l'intégrale du signal fluorescent.....	91
Figure 30 : Le nombre de microtubules par faisceaux est réduit chez le double mutant <i>eb1a-2 eb1b-3</i>	93
Figure 31 : Le nombre de microtubules par faisceaux est réduit chez le mutant <i>map65-1.1</i>	93
Figure 32 : Anisotropie du réseau cortical de microtubules dans les cellules en élongation du mutant <i>map65-1</i>	95
Figure 33 : Principe de la soustraction d'image consécutive pour améliorer la lecture des kymographes.....	97
Figure 34 : Dynamique des microtubules chez les mutants <i>eb1a-2 eb1b-3</i> et <i>map65-1</i>	98
Figure 35 : Réorientation du réseau cortical de microtubule après un traitement à l'auxine chez le mutant <i>eb1a-2 eb1b-3</i>	99
Figure 36 : Déviation de la racine des simples et double mutant de EB1a et EB1b dans le fond génétique Col-0.	101
Figure 37 : Hypersensibilité de la racine du double mutant au toucher induit par le contact avec le milieu.....	102
Figure 38 : Hypersensibilité du double mutant <i>eb1a-2 eb1b-3</i> au toucher induit par le milieu vertical.	103
Figure 39 : Expression de la protéine EB1 b chez <i>E.coli</i>	105
Figure 40 : Polymérisation de microtubules <i>in vitro</i> en présence de EB1b ou EB1 murin.....	107
Figure 41 : Paramètres de l'instabilité dynamique des microtubules mesurés <i>in vitro</i> en présence de EB1 b et de EB1 mouse.....	108
Figure 42 : Résultats préliminaire de l'effet de EB1 b sur la formation des faisceaux de microtubules <i>in vitro</i>	109
Figure 43 : Co-localisation de la protéine EB1 a avec le réticulum endoplasmique.	111

Figure 44 : Ultrastructure des compartiments endomembranaire chez le double mutant *eb1a-2 eb1b-3*..... 113

Figure 45 : EB1a et EB1b contribuent à la balance entre thigmotropisme et gravitropisme *via* leur rôle dans l'organisation du réseau cortical de microtubules. 116

Avant-propos

Les microtubules sont des polymères protéiques essentiels au fonctionnement des cellules eucaryotes. La majeure partie de leurs rôles est dépendante de facteurs qui s'y associent. Parmi ces facteurs, la protéine EB1 (End Binding 1) se localise à l'extrémité en croissance des microtubules, où elle recrute un nombre important de partenaires. Cette particularité fait de EB1 un acteur clé d'un grand nombre de processus cellulaires chez les animaux et les levures, comme la croissance polarisée, la migration, la division ou bien encore la morphogenèse. EB1 est également présente chez les plantes, comme *Arabidopsis thaliana*, mais ses fonctions sont loin d'être élucidés dans ce contexte physiologique particulier où les microtubules présentent des organisations et un comportement dynamique différents de ceux des autres règnes. Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux fonctions subcellulaires de la protéine EB1 chez *Arabidopsis thaliana*.

Ce manuscrit de thèse débute par une introduction sur le cytosquelette avec une attention particulière portée sur les microtubules et les mécanismes impliqués dans la régulation de leur dynamique et dans leur organisation en réseaux plus ou moins complexes. Les cinq chapitres suivant traitent des résultats obtenus pendant ce travail de thèse. Le premier chapitre présente la contribution des protéines EB1 et MAP65-1 à la formation de faisceaux de microtubules et à l'organisation globale du réseau cortical. Dans ce chapitre sont également décrites les mises au point nécessaires à la quantification des phénotypes observés chez les mutants « perte de fonction » de ces deux protéines. La seconde partie traite de l'instabilité dynamique des microtubules, observée chez les mutants de EB1 et MAP65-1. Le chapitre suivant concerne les phénotypes macroscopiques racinaires observés chez les mutants de EB1, notamment de son hypersensibilité au toucher. Le quatrième chapitre expose les résultats obtenus, concernant les propriétés intrinsèques de la protéine EB1b, par l'utilisation d'un système acellulaire. Le dernier chapitre des résultats présente les données obtenues sur le lien supposé entre EB1 et l'organisation du réticulum endoplasmique. La partie résultats est suivie de deux chapitres présentant la discussion et les perspectives de ce travail. L'avant dernier chapitre décrit le matériel et les méthodes utilisés au cours de cette étude. Enfin, des annexes contribuent à illustrer les résultats expérimentaux de cette thèse.

Introduction.

I. Le cytosquelette

1) Le cytosquelette, quelques généralités

a) Les acteurs principaux

Le cytosquelette est l'ensemble des polymères protéiques conférant aux cellules leurs propriétés mécaniques et architecturales (Figure 1). C'est un élément essentiel au fonctionnement de la plupart des cellules eucaryotes. Il est en général décrit comme étant constitué de trois types de fibres, les microfilaments ou filaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules, mais, comme nous le verrons à la fin de cette partie, les septines peuvent être considérées comme étant un quatrième membre du cytosquelette.

i. Les microfilaments d'actine

Les filaments d'actine sont les fibres les plus fines du cytosquelette. Les filaments d'actine sont très flexibles et forment le plus souvent un réseau dense et réticulé (Figure 2 C et D). Ces fibres résultent de la polymérisation de l'actine-G (globulaire) en actine-F (filamenteuse). L'actine-G est une protéine de 375 acides aminés, associée à un nucléotide, l'ATP ou l'ADP. Sa séquence est très conservée parmi les eucaryotes, mais il existe différentes isoformes ayant chacune leurs spécificités. Les oiseaux et les mammifères possèdent 6 gènes, codant chacun une isoforme (Perrin et Ervasti, 2010) ; l'une d'entre elles est exprimée spécifiquement dans les muscles squelettiques, l'actine- $\alpha_{\text{squelettique}}$, une autre dans le muscle cardiaque, l'actine- $\alpha_{\text{cardiaque}}$, deux autres dans les muscles lisses, l'actine- α_{lisse} et l'actine- γ_{lisse} , alors que les deux dernières, l'actine- β_{cyto} et l'actine- γ_{cyto} , sont ubiquitaires. Alors que le nombre de gènes codant l'actine semble bien conservé parmi les animaux, ce n'est pas forcément le cas chez les plantes. Ainsi, l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* ne possède qu'un gène codant l'actine alors que la plupart des plantes supérieures en ont une dizaine. A titre d'exemple, le génome de *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) contient 10 gènes codant de l'actine alors que celui du soja (*Glycine max*) en contient 17. Les dix gènes de *A. thaliana* peuvent être séparés en deux groupes en fonctions des tissus dans lesquels ils s'expriment ; les actines reproductives et les actines végétatives (Gunning *et al.*, 2015), cette distinction peut être faite chez la plupart des plantes supérieures.

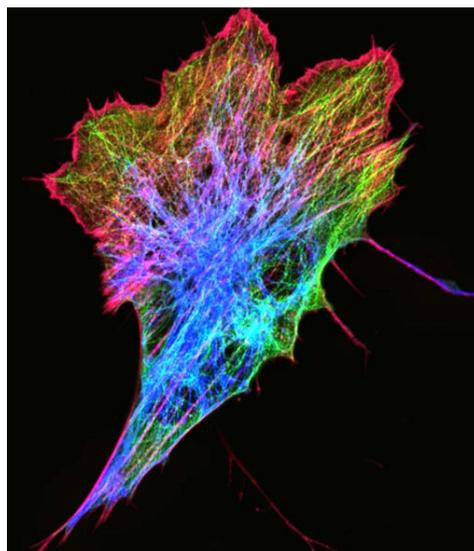


Figure 1 : Organisation du cytosquelette.

Fibroblaste de poisson zèbre. En vert les microtubules (GFP-tubuline), un type de filament intermédiaire en bleu (mCherry-Vimentine) et en rouge l'actine (Alexa Fluor 647 phalloïdine). D'après Fischer et Fowler 2015.

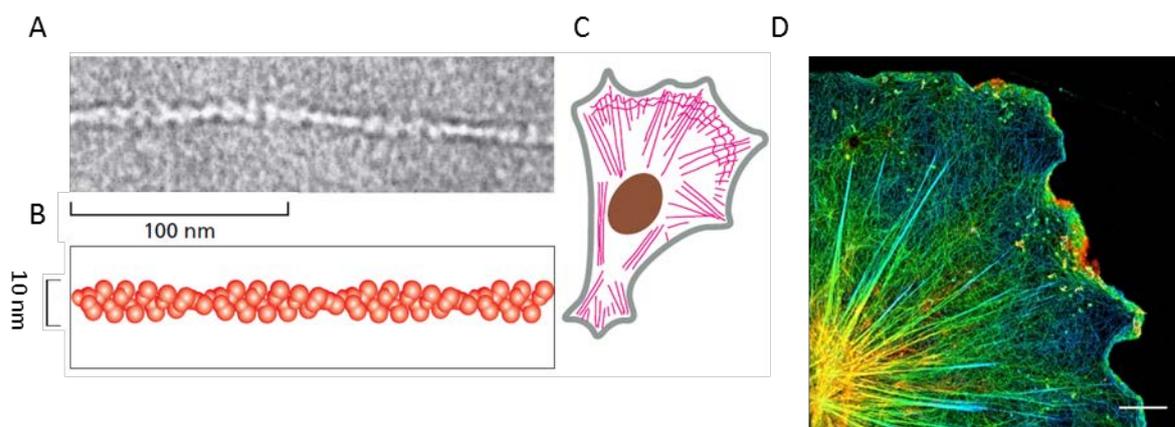


Figure 2 : Structure et organisation des filaments d'actine.

(A) Filament d'actine observé en microscopie électronique.

Molecular Biology of the Cell 5th edition (© Garland Science 2008).

(B) Structure schématique d'un filament actine.

Molecular Biology of the Cell 5th edition (© Garland Science 2008).

(C) Organisation schématique du réseau de filaments d'actine dans une cellule.

Molecular Biology of the Cell 5th edition (© Garland Science 2008).

(D) Réseau d'actine dans une cellule gliale en STROM 3D (phalloïdine Alexa Fluor 647). Le code couleur correspond à la position en Z, -400 nm (bleu) + 400 nm (rouge). Barre d'échelle 5nm.

Avec la permission de C. Leterrier, CRN2M, Marseille.

Lorsque l'on a été capable de purifier de l'actine soluble et de faire polymériser des filaments par l'ajout d'ATP, il a été possible de comprendre la structure et la dynamique d'assemblage et de désassemblage de ces filaments (Moring *et al.*, 1975). Les fibres obtenues par polymérisation de l'actine-G forment une double hélice mesurant entre 5 et 10 nm de diamètres (Figure 2 A). Les monomères d'actine étant tous orientés de la même façon dans les fibres, celles-ci présentent donc deux extrémités de structures différentes ; l'extrémité pointue et l'extrémité barbée. Ces deux extrémités ne présentent pas les mêmes propriétés biochimiques, comme nous allons le voir par la suite.

In vitro, à partir d'une certaine concentration d'actine, des filaments vont se former. La création de ces filaments nécessite l'interaction de plusieurs monomères pour former une ébauche de filament. Lorsqu'un dimère est formé, il est peu stable, il faut l'ajout d'un troisième monomère pour permettre la stabilisation du « noyau de nucléation » ainsi formé. Cette étape de nucléation est énergétiquement défavorable. De fait, lorsque de l'actine soluble est suffisamment concentrée il y a une phase de latence avant l'apparition des filaments (phase A sur la courbe, Figure 3), cette phase correspond à la formation des « noyaux » de nucléation (phase B sur la courbe, Figure 3). Les trimères vont recevoir de nouveaux monomères pour former des filaments. L'ajout de monomères étant proportionnel à la concentration en monomères solubles, cette étape de polymérisation (phase d'élongation, phase C sur la courbe, Figure 3), en faisant chuter la concentration d'actine soluble, réduit en même temps le taux d'incorporation de monomères aux filaments jusqu'à ce qu'un plateau soit atteint (phase D sur la courbe, Figure 3). A cette étape, à l'échelle de la population de filaments, les taux d'incorporation et de dissociation sont égaux.

Les filaments étant polarisés, les deux extrémités ne se comportent pas de la même manière. Ainsi, l'une des extrémités croît plus vite que l'autre. L'extrémité la plus rapide est appelée extrémité (+) ou barbée, et la plus lente, l'extrémité (-) ou pointue. L'extrémité (+) peut polymériser jusqu'à dix fois plus rapidement que l'extrémité (-). Les constantes d'association (k_{on}) et de dissociation (k_{off}) sont plus élevées à l'extrémité (+) qu'à l'extrémité (-). Ainsi l'extrémité (+) polymérise plus vite mais elle dépolymérise également plus rapidement que l'extrémité (-). Au plateau, la masse d'actine F est constante, mais les filaments d'actine demeurent dynamiques. A cette étape, la polymérisation et la

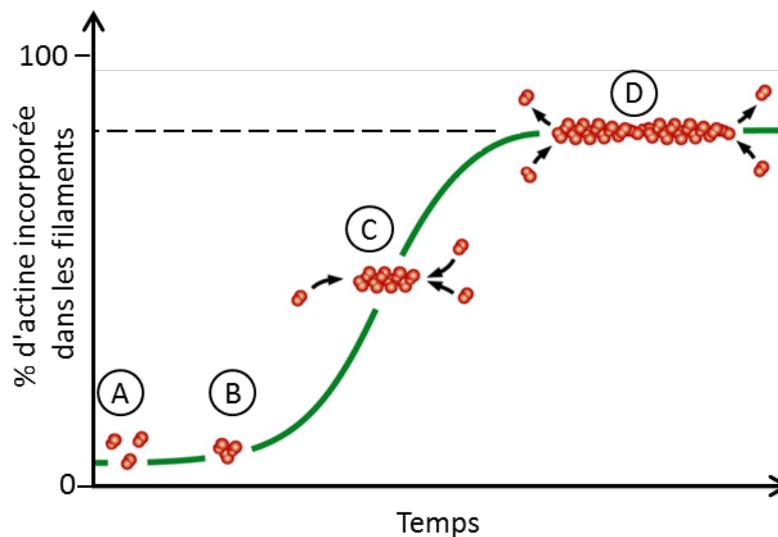


Figure 3 : Polymérisation de l'actine soluble en filaments.

(A) Phase de latence : l'actine-G s'assemble en dimères peu stable.

(B) Formation des noyaux de nucléation : les dimères sont stabilisés par l'ajout d'une troisième sous-unité. Les trimères ainsi formés constituent les noyaux de nucléations.

(C) Phase d'élongation : les filaments croissent par l'ajout de nouvelles sous-unités aux noyaux de nucléation.

(D) Plateau : la formation de filaments fait chuter la concentration en actine-G, le taux d'incorporation diminue jusqu'à atteindre un plateau.

Inspiré de Molecular Biology of the Cell 5th edition (© Garland Science 2008).

dépolymérisation des filaments d'actine ont lieu au même taux. Pour une concentration (C) donnée en actine G on a un comportement que l'on peut décrire par l'équation suivante : $k_{on} \times C = k_{off}$ (contrairement à la polymérisation, la dépolymérisation de l'actine F est indépendante de la concentration en actines libres).

L'actine est une ATP-ase, c'est-à-dire qu'elle peut hydrolyser l'ATP en ADP + P_i. Notons que l'actine-ADP a une moindre affinité pour le filament que l'actine-ATP et donc plus de chance de se détacher. Ainsi, $k_{on}^T \gg k_{on}^D$ et $k_{off}^D \gg k_{off}^T$, à tel point que k_{on}^D et k_{off}^T sont si faibles qu'ils peuvent être ignorés pour plus de simplicité (les indices T et D désignent les constantes pour les formes ATP ou ADP de l'actine). De ce fait, au plateau, lorsqu'il y a autant d'association que de dissociation, $k_{on}^T \times C = k_{off}^D$. Cette équation permet de calculer une valeur de C particulière, appelée « concentration critique » (C_c), à laquelle les taux de polymérisation et de dépolymérisation sont égaux ; $C_c = k_{off}^D / k_{on}^T$. L'hydrolyse de l'ATP est facilitée dans les filaments par rapport aux monomères. Si la vitesse de polymérisation dépasse la vitesse à laquelle l'ATP est hydrolysé, une coiffe composée d'actine-ATP se forme à l'extrémité du filament. Sachant que $k_{off}^T \ll k_{off}^D$, la présence d'une actine-ATP à l'extrémité du filament lui évite de dépolymériser. L'affinité des deux extrémités pour l'actine n'étant pas la même, on obtient deux valeurs de C_c différentes pour chaque extrémité ;

$$C_c (+) = k_{off}^D (+) / k_{on}^T (+)$$

et

$$C_c (-) = k_{off}^D (-) / k_{on}^T (-)$$

avec

$$k_{on}^T (+) > k_{on}^T (-)$$

donc

$$C_c (-) > C_c (+).$$

Il existe donc une gamme de concentration comprise entre C_c (-) et C_c (+) où l'extrémité (+) polymérise alors que l'extrémité - dépolymérise. Dans cette gamme de concentrations il en existe une à laquelle l'extrémité (+) polymérise aussi vite que l'extrémité (-) dépolymérise, ce qui donne lieu au phénomène dit du « tapis roulant », au cours duquel le filament semble se déplacer du côté de son extrémité (+) tout en gardant sa taille puisque les taux d'association à l'extrémité (+) et de dissociation à l'extrémité (-) sont égaux.

ii. Les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires sont les filaments les moins conservés parmi les eucaryotes et forment un groupe disparate. Les protéines formant les filaments intermédiaires sont

identifiées plutôt sur la base de la conservation de domaines que sur des homologies de séquence. En effet, ces protéines possèdent généralement une partie centrale en « coiled-coil », super-enroulement de plusieurs hélices α , composée d'une quarantaine de répétitions du domaine « heptad » impliqué dans leur dimérisation. Cette partie centrale est flanquée d'une région carboxy-terminale et d'une région amino-terminale toutes deux très peu conservées. La partie centrale est divisée en quatre sous-domaines dont les tailles sont conservées, notamment chez les métazoaires (Cabeen et Jacobs-Wagner, 2010).

L'unité de base des filaments intermédiaires est un dimère. Deux de ces dimères s'associent ensuite de façon « antiparallèle » pour former un tétramère. Le tétramère ainsi formé n'est donc pas polarisé, l'association des deux dimères se faisant de façon antiparallèle. Les dimères et les tétramères sont les formes solubles des filaments intermédiaires. Huit tétramères vont s'associer pour former un octamère, contenant donc 32 monomères. Les filaments sont formés par la succession d'octamères, s'associant longitudinalement pour former un long filament (Figure 4 A). A l'image des tétramères les filaments intermédiaires ne sont pas polarisés.

Les filaments intermédiaires mesurent une dizaine de nanomètres de diamètre (Figure 4 A et B) et forment un réseau de fibres assez dense et très flexible (Figure 4 C). Chez les vertébrés, il existe 8 grands types de filaments intermédiaires : (1) les lamines (A, B et C) qui sont nucléaires et ubiquitaires, (2) les kératines de type I et II, présentent dans les cellules épithéliales, (3) les neurofilaments et (4) les vimentines, les desmines, les péripherines et les protéines fibrillaires gliales qui sont toutes apparentées et présentent dans les cellules d'origines mésenchymateuses, les muscles, certains neurones et les cellules gliales respectivement. Si les lamines sont conservées chez la plupart des eucaryotes, l'existence d'autres filaments intermédiaires que les lamines chez les plantes n'est pas assurée. Il est intéressant de noter que, contrairement à l'actine, et la tubuline qui sont ubiquitaires, les filaments intermédiaires présentent une grande spécificité tissulaire.

Les filaments intermédiaires sont des structures apolaires dotées d'une grande stabilité. Toutefois, des expériences de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) (Figure 5) (Vikstrom *et al.*, 1992) ont permis de mettre en évidence une relative dynamique d'échanges des sous unités protéiques entre les filaments et le cytosol. Ces échanges concernent le filament sur toute sa longueur, au contraire de l'actine F et des microtubules pour lesquels

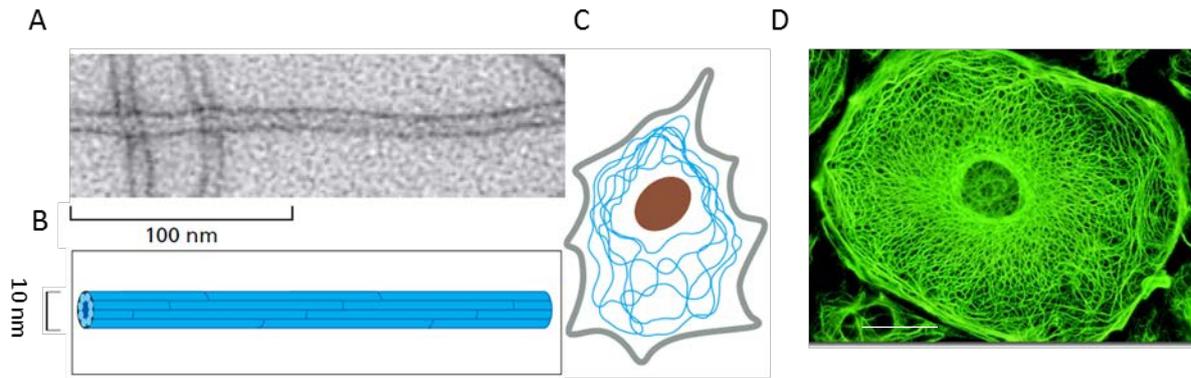


Figure 4 : Structure et organisation des filaments intermédiaires.

(A) Filament intermédiaire observé en microscopie électronique.

Molecular Biology of the Cell 5th edition (© Garland Science 2008).

(B) Structure schématique d'un filament intermédiaire.

Molecular Biology of the Cell 5th edition (© Garland Science 2008).

(C) Organisation schématique du réseau de filaments d'actine dans une cellule.

Molecular Biology of the Cell 5th edition (© Garland Science 2008).

(D) Réseau de kératine dans une cellule épithéliale de rein de rat kangourou.

www.microscopyu.com (site éducatif de Nikon). Barre d'échelle, 10 μm.

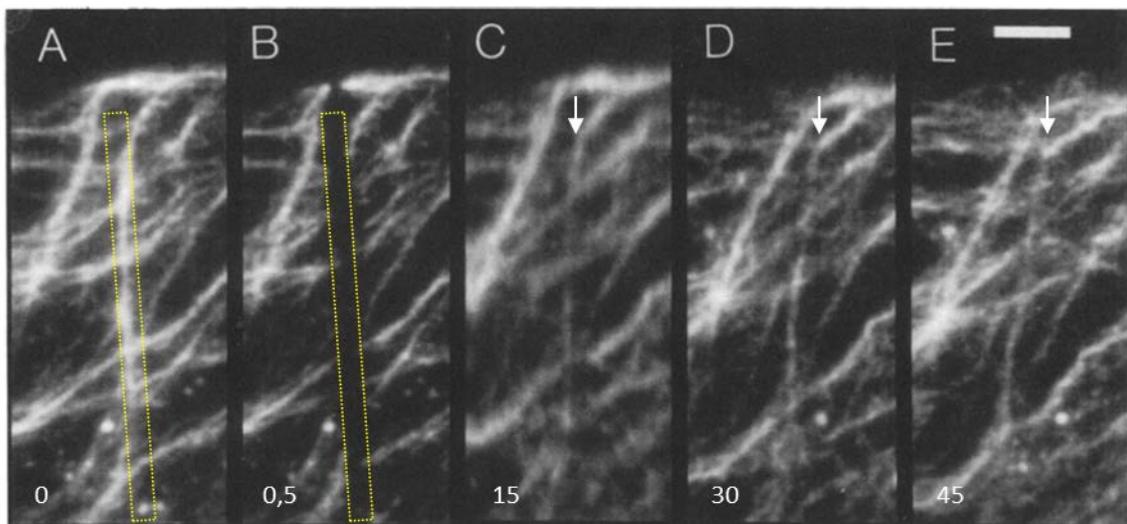


Figure 5 : Dynamique des filaments intermédiaires.

Réseau de filaments intermédiaires observé après micro-injection de vimentine-xrhodamine dans des cellules 3T3. En 15 minutes la fluorescence est revenue dans la zone photo-blanchie en (B) illustrant la dynamique des filaments intermédiaires. Barre d'échelle, 5μm.

Inspiré de Vikstrom *et al.*, 1992.

seules les extrémités sont concernées. La faible dynamique des filaments intermédiaires se démarque du caractère profondément instable de l'actine F et des microtubules que nous détaillerons dans les paragraphes suivant.

iii. Les microtubules

Comme leur nom l'indique, les microtubules sont des tubes creux. Ce sont des polymères de tubulines α et β . Les tubulines α et β sont des petites protéines G (petites GTPases) de 450 acides aminés ayant chacune un site de fixation au GTP. Avant de pouvoir se polymériser en microtubules, les tubulines α et β forment un hétérodimère. Lors de cette étape, le GTP lié à la tubuline α est bloqué dans son site de liaison par la formation du dimère et ne sera ni hydrolysé ni échangé. Ce sont ces hétérodimères de tubulines α et β qui polymérisent pour former le microtubule. L'arrangement tête-à-queue des hétérodimères de tubulines dans la paroi des microtubules décrit un certain nombre de protofilaments associés latéralement pour former un tube d'environ 25 nm de diamètre (Figure 6 A, B et C). Les protofilaments étant tous orientés de la même façon, le microtubule est une structure polarisée ; une extrémité expose la tubuline α des premiers dimères de la structure et l'autre expose la tubuline β des derniers dimères ajoutés. L'extrémité exposant la tubuline β est aussi appelée extrémité (+) et celle exposant la tubuline α extrémité (-). Cette dénomination est fondée sur le comportement cinétique des deux extrémités qui diffèrent notablement. Les propriétés dynamiques des microtubules seront abordées plus tard (chapitre I 2 b). Nous verrons également par la suite que ces polarités biochimique et cinétique s'associent à une polarité architecturale. Ces différentes polarités participent à l'existence d'une polarité de fonction, essentielle à la cellule. Comme celle de l'actine, la séquence de la tubuline est très conservée. A titre d'exemple, les séquences de la levure et de l'homme partagent 75% d'identité. Il existe plusieurs isoformes de chacune des deux tubulines ; l'homme possède cinq isoformes de la tubuline α et huit isoformes de la tubuline β . A l'instar de l'actine, le nombre d'isoformes de tubulines α et β semble être plus élevé chez les plantes, ainsi le peuplier (*Populus tremuloides*) possède huit gènes codant des tubulines α et vingt gènes codant des tubulines β alors que l'arabette des dames (*A. thaliana*) en possèdent respectivement 6 et 9 (Hashimoto, 2013).

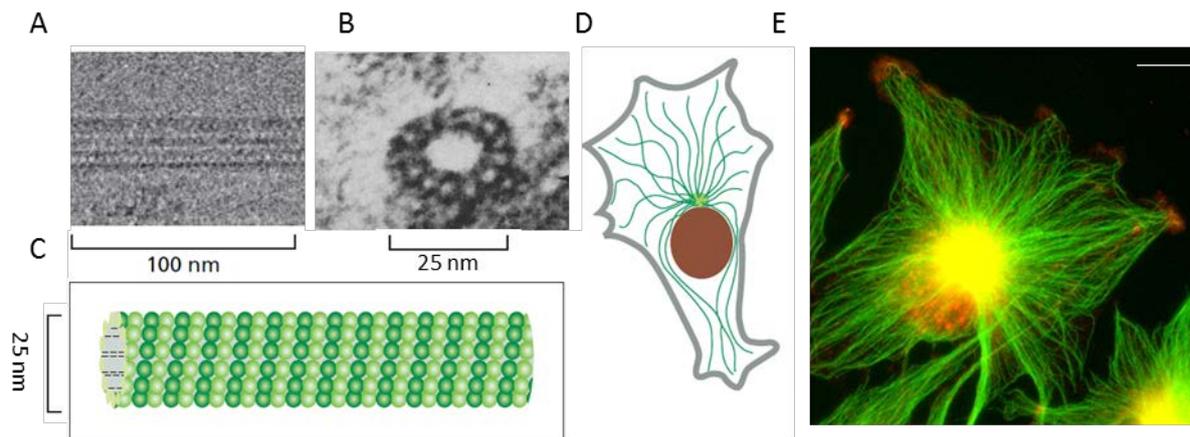


Figure 6 : Organisation et structure des microtubules.

(A) Microtubule observé en microscopie électronique.

Molecular Biology of the Cell 5th edition (© Garland Science 2008).

(B) Microtubule observé en microscopie électronique dans une coupe transverse de racine de *Juniperus chinensis*. x740 000. Inspiré de Ledbetter et Porter, 1964.

(C) Structure schématique d'un microtubule.

Molecular Biology of the Cell 5th edition (© Garland Science 2008).

(D) Organisation schématique du réseau de filaments d'actine dans une cellule fibroblastique.

Molecular Biology of the Cell 5th edition (© Garland Science 2008).

(E) Organisation du réseau de microtubules (en vert) dans une cellule humaine (U373). Barre d'échelle 10 μm.

E. Camand, Institut Curie.

iv. Les septines

Les septines, comme les autres filaments du cytosquelette sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires, du recrutement de partenaires jusqu'à la déformation des membranes, en passant par la détection de courbures. Elles semblent jouer ces rôles *via* leur capacité à former des filaments et des structures complexes. Si nous retenons comme définition du cytosquelette celle généralement acceptée, à savoir : l'ensemble des polymères protéiques conférant à la cellule ses propriétés mécaniques et architecturales, il apparaît que les septines peuvent être considérées comme le quatrième membre du cytosquelette. Cependant, de façon surprenante, il ne semble pas y avoir de septine chez les plantes supérieures (Yamazaki *et al.*, 2013), on les retrouve uniquement chez les algues, les levures et les animaux.

Les septines ont été découvertes chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) pour leur rôle dans la division cellulaire. Leur capacité à former des filaments n'est apparue que plus tard et c'est bien plus récemment que des homologues des septines ont été identifiés chez la plupart des eucaryotes, y compris l'homme. La levure *S. cerevisiae* compte sept gènes codant pour des septines, *Caenorhabditis elegans* n'en a que deux, alors que l'homme en possède treize. Chez les mammifères, les septines ont un domaine central dont la séquence est très conservée. Celui-ci contient une région d'interaction avec les phosphoinositides, un site de liaison du GTP et une cinquantaine d'acides aminés de fonctions inconnues mais spécifiques des septines (Mostowy et Cossart, 2012). Le site de liaison du GTP et les parties carboxy- et amino- terminales des septines sont impliqués dans la capacité de ces protéines à former des oligomères, puis des structures plus complexes. En effet, les septines sont capables de former des hétéro-oligomères qui interagissent ensuite pour former des structures plus élaborées comme des filaments et des anneaux. Dans tous les cas, à l'image des filaments intermédiaires, les filaments ainsi formés n'ont pas de polarité.

Le modèle d'interaction des septines entre elles et de la formation de ces structures n'est pas complet et le rôle joué par le GTP n'y est pas clair. Les septines sont capables d'hydrolyser le GTP, ce qui peut entraîner un changement de conformation du domaine de liaison au GTP et donc réguler l'interaction entre septines. Cependant, certaines septines appartenant au groupe de SEPT6 ne sont pas capables d'hydrolyser le GTP, tout en ayant conservé la capacité de former des filaments. Le rôle joué par le GTP et par son hydrolyse

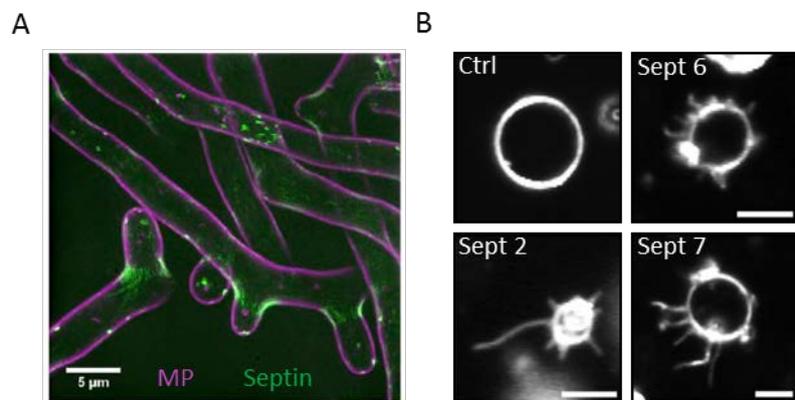


Figure 7 : Septines et courbures de membranes.

(A) Localisation de CDC11a-GFP (vert), une septine, et du FM4-64 (violet) chez *A. gossypii*. CDC11a se localise au niveau des courbures de la membrane plasmique.

(B) Effet des septines 2/6/7 sur des liposomes géants. Les septines induisent des tubulations de la membrane lipidique. Barre d'échelle, 10 μm.

Adapté de Bridges *et al.* 2016 et Tanaka-Takiguchi *et al.* 2009

dans la régulation de l'assemblage des septines semble donc différent de celui joué par le GTP ou l'ATP dans la dynamique d'assemblage des filaments d'actine et de tubuline.

La forme polymérisée des septines est considérée comme étant la forme biologiquement active. En effet, c'est sous cette forme que les septines interviennent dans la division cellulaire, la ciliogenèse, et la neurogenèse. En plus de leur capacité à former des filaments, les septines ont la propriété d'interagir avec les membranes. Cette interaction leur permet de modifier la forme de certaine membrane (Figure 7 B) (Tanaka-Takiguchi *et al.*, 2009) et probablement de détecter certaines déformations (Bridges *et al.*, 2016) (Figure 7 A). *In vitro*, la présence de membrane facilite l'assemblage des filaments de septines ce qui révèle une interdépendance entre membranes et septines. En plus d'interagir avec les membranes, les septines interagissent avec les constituants du cytosquelette que sont les filaments d'actine et les microtubules. Ces interactions ont été révélées par l'utilisation de drogues entraînant la disparition des filaments d'actine ou des microtubules. Lors de tels traitements, l'organisation des filaments de septines était perturbée voir même abolie (Kinoshita *et al.*, 2002). En interagissant avec la membrane plasmique et le cytosquelette, les septines confèrent de la rigidité à la membrane plasmique ; la perte de fonction de SEPT2 et SEPT11 réduit la rigidité et l'élasticité des cellules (Mostowy *et al.*, 2011, Mostowy et Cossart, 2012).

L'implication des septines dans de nombreux événements cellulaires semble être due à leur capacité à servir de barrière de diffusion et/ou de point de recrutement pour de multiples protéines. Par exemple, lors de la division cellulaire, chez les levures comme chez les mammifères, les septines forment un anneau au site de division. Cette structure ne semble pas impliquée dans la génération de force nécessaire à la division, mais plutôt dans le recrutement de nombreuses protéines impliquées dans le processus de division.

b) Conservations des séquences et cytosquelettes procaryotes

Comme évoqué précédemment, le cytosquelette est un acteur essentiel de l'architecture et du bon fonctionnement des cellules eucaryotes. Toutefois, les procaryotes semblent en être pourvus aussi dans une certaine mesure. Parmi les procaryotes, des structures fibrillaires ont effectivement été observées dans plus de 50 taxa (Bermudes *et al.*, 1994) (Figure 8 A, B et C). L'étude des homologues procaryotes des protéines constituant le cytosquelette des eucaryotes permet de mieux comprendre l'origine, l'évolution et les mécanismes de formation

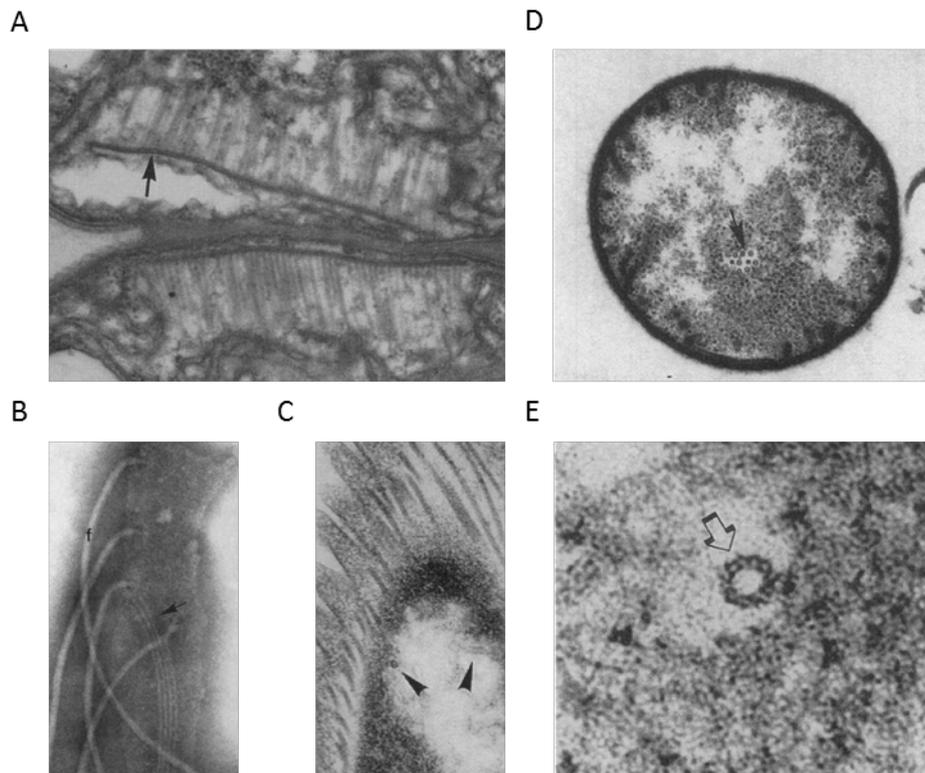


Figure 8 : Filaments cytoplasmique procaryotes.

(A) Filaments de la plaque chez *Nostoc puniforme* UTEX LB 756. x 150 000.

(B) Tubules cytoplasmiques chez *Treponema reiteri*. x 112 000.

(C) Structures tubulaires (pointes de flèches) chez *Pillotina sp.*

(D) Section transverse d'un groupe de tubules (flèche) chez *Azotobacter vinelandii*. x 52 000.

(E) Un des tubules à plus fort grossissement chez *Azotobacter vinelandii*. x 512 000.

Adapté de Bermudes *et al.*, 1994.

de ces filaments. Si la plupart de ces structures n'ont rien de semblable avec les filaments du cytosquelette tels qu'on les trouve dans les cellules eucaryotes, certaines d'entre elles ressemblent à des microtubules (Figure 8 D et E). L'identification des protéines constituant ces filaments constitue un des moyens de trouver les « tubulines procaryotes » et donc de pouvoir étudier l'évolution de la tubuline entre les différents règnes ou domaines du vivant.

La protéine FtsZ a été identifiée pour son rôle dans la division bactérienne chez *Escherichia coli*. Elle forme un anneau accolé à la membrane plasmique (Figure 9 A) et permet la constriction de celle-ci au niveau du site de division. De plus, FtsZ forme des tubes *in vitro*, de 15 à 25 nm de diamètres suivant les conditions expérimentales, pouvant posséder jusqu'à 12 protofilaments. A l'instar de la tubuline, FtsZ ne polymérise qu'en présence de GTP (Erickson, 1995), auquel elle se lie et dont elle peut catalyser l'hydrolyse en GDP en présence de magnésium. Cette hydrolyse semble être dépendante de la concentration en FtsZ. Si la partie C-ter de FtsZ est variable parmi les bactéries et très peu ressemblante à la tubuline, sa partie N-terminale présente de nombreuses similitudes de séquence avec la tubuline notamment la conservation du motif (SAG)GGTG(SA)G caractéristique des tubulines Erickson, 1995. Par ailleurs, FtsZ et la tubuline présentent de fortes ressemblances à l'échelle de leur structure moléculaire (Lowe et Amos, 1998 Ortiz *et al.*, 2016). Ainsi, FtsZ est le candidat idéal pour assurer les tâches de « tubuline procaryote ». Cependant, aucun tube n'a été décrit jusqu'à maintenant *in vivo* au septum de *Escherichia coli*. Il est à noter toutefois que certaines bactéries du genre *Azotobacter* présentent dans leur cytoplasme des tubes dont la structure paraît très proche de celle des microtubules (Figure 8 D et E).

Il existe d'autres gènes codant pour des protéines aux propriétés et aux structures proches de celle de la tubuline. Nous pouvons citer TubZ (*Bacillus thuringiensis*) qui partage des similitudes avec la tubuline et FtsZ, et BtubA et BtubB (genre *Prostheco bacter*) qui sont similaires à la tubuline. TubZ forme des filaments *in vitro* et *in vivo* (Figure 9 B), et semble impliquée dans la ségrégation des plasmides bactériens au moment de la division. BtubA et BtubB forment des filaments *in vivo* qui contiennent cinq protofilaments (Pilhofer *et al.*, 2011) (Figure 9 B) et, de façon surprenante, elles ne forment des filaments *in vitro* que lorsqu'ils sont présents à une stœchiométrie 1:1 comme les tubulines α et β . Leur capacité à hydrolyser le GTP est faible mais est multipliée par trois lors de la formation de l'hétérodimère. (Cabeen et Jacobs-Wagner, 2010).

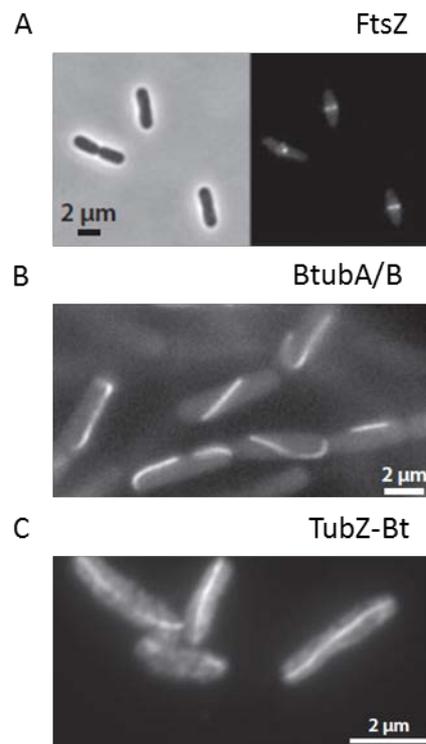


Figure 9 : Localisation des homologues bactériens de la tubuline.

(A) Anneau FtsZ-GFP chez *Escherichia coli*.

(B) Immunofluorescence contre BtubA/B produits chez *E. coli*.

(C) TubZ-GFP localization in *Bacillus thuringiensis*.

Adapté de Cabeen et Jacobs-Wagner, 2010.

De façon parallèle, différents homologues procaryotes de l'actine ont été identifiés. Le plus connu d'entre eux est ParM. ParM forme des filaments *in vitro* et *in vivo*. Ces filaments possèdent deux brins qui décrivent deux hélices gauches. Ces filaments sont dynamiques et sont capables d'hydrolyser l'ATP. Lors de la division cellulaire chez *Escherichia coli*, ils sont organisés de façon à former un faisceau au centre de la bactérie et à interagir avec les plasmides aux extrémités de la cellule. Cette organisation permet à ParM de ségréger les plasmides (Eun *et al.*, 2015) lors de la division. MreB (*Escherichia coli*) est une autre protéine bactérienne ayant une structure similaire à l'actine. MreB forme des filaments *in vitro* et *in vivo*. Elle est impliquée dans le maintien de la taille et de la forme des bactéries. Ces filaments semblent dynamiques dans le cytoplasme de certaines bactéries et interagissent avec les enzymes responsables de la synthèse de la paroi comme le font les microtubules dans les cellules végétales (Chapitre III).

Par ailleurs, il est intéressant de noter que les bactéries possèdent de nombreuses protéines capables de former des polymères filamenteux ou non. Parmi ces protéines, un certain nombre sont des enzymes. Certaines de ces enzymes, telle la CTP (Cianine Tri-Phosphate) synthase de *Caulobacter*, ont des fonctions qui reposent moins sur leur activité enzymatique que sur leur capacité à former un polymère. De plus, la plupart des protéines homologues de l'actine et de la tubuline sont elles aussi des enzymes, ATP-ases ou GTP-ases. De ce fait, on peut imaginer, que les éléments du cytosquelette eucaryotes que sont l'actine et la tubuline aient évolué à partir d'enzymes métaboliques qui avaient tendance à polymériser indépendamment de leur fonction première.

Les filaments intermédiaires semblent également représentés chez les procaryotes. Des protéines ont été identifiées plus sur la base de leur capacité à former des filaments apolaires essentiels à la morphogénèse des bactéries que sur des similitudes de séquences.

La crescentine est le membre fondateur d'une famille de protéines bactériennes similaires aux filaments intermédiaires. Elle a été identifiée chez *Caulobacter crescentus* pour son rôle dans la morphologie courbe de cet organisme. La protéine forme des filaments *in vitro* et sa distribution est cohérente avec celle d'un filament *in vivo*. D'autres protéines aux propriétés similaires aux filaments intermédiaires ont été identifiées. Elles présentent toutes des propriétés morphogénétiques et sont capables de former des filaments *in vitro*.

Il est intéressant de noter que dans le génome plastidiale de certaines plantes, des séquences codant pour FtsZ aient été conservées pour la division des plastes. Chez *Arabidopsis*, il existe deux protéines AtFtsZ1 et AtFtsZ2 dont l'hétérodimère forme un anneau au milieu du plaste lors de sa division de façon similaire à FtsZ chez *E. coli*.

c) Fonctions généralement associées au cytosquelette chez les eucaryotes

i. Organisation du cytoplasme et trafic intracellulaire

Les fibres du cytosquelette forment un « squelette » plus ou moins rigide sur lequel la membrane plasmique est en quelque sorte tendue. A l'intérieur de la cellule, de nombreux compartiments sont amenés à se former, à se déplacer, à fusionner les uns avec les autres ou à changer de taille et de forme. Compte tenu de leur localisation et de leurs propriétés, les filaments du cytosquelette constituent des acteurs essentiels à l'ensemble de ces processus ; une coordination des différents éléments du cytosquelette est donc nécessaire à l'organisation et au fonctionnement des différents compartiments subcellulaires.

Dans les cellules animales, les microtubules jouent un rôle prépondérant dans l'organisation des compartiments internes. La figure 10 illustre la coordination et le rôle joué par les microfilaments d'actine et par les microtubules dans le positionnement des mélanosomes des mélanocytes. En effet, certaines espèces de poissons et d'amphibiens sont capables de changer la teinte de leur peau en fonction de stimuli extérieurs. Les mélanocytes de leur peau contiennent des pigments (de la mélanine), fabriqués dans des compartiments spécialisés, les mélanosomes. Les mélanosomes peuvent être concentrés au milieu de la cellule ou être dispersés dans le cytoplasme ce qui modifie les propriétés optiques des mélanocytes et donc de la peau (Figure 10 B). La dispersion des mélanosomes en réponse à différent stimuli requiert des réseaux de microtubules et de filaments d'actine fonctionnels (Figure 10). Dans les mélanocytes, comme dans une grande partie des cellules animales, le réseau de microtubules est organisé à partir d'un centre organisateur depuis lequel les microtubules se déploient. En revanche, c'est en périphérie de la cellule que se trouve un réseau dense de filaments d'actine entrecroisés. Ainsi, lorsque les réseaux d'actine et de microtubules sont fonctionnels, les mélanosomes se déplacent du centre jusqu'à la périphérie de la cellule en réponse à un traitement à l'adrénaline et de la périphérie jusqu'au centre lors d'un traitement à la mélatonine. En revanche, lorsque le réseau d'actine est détruit par un

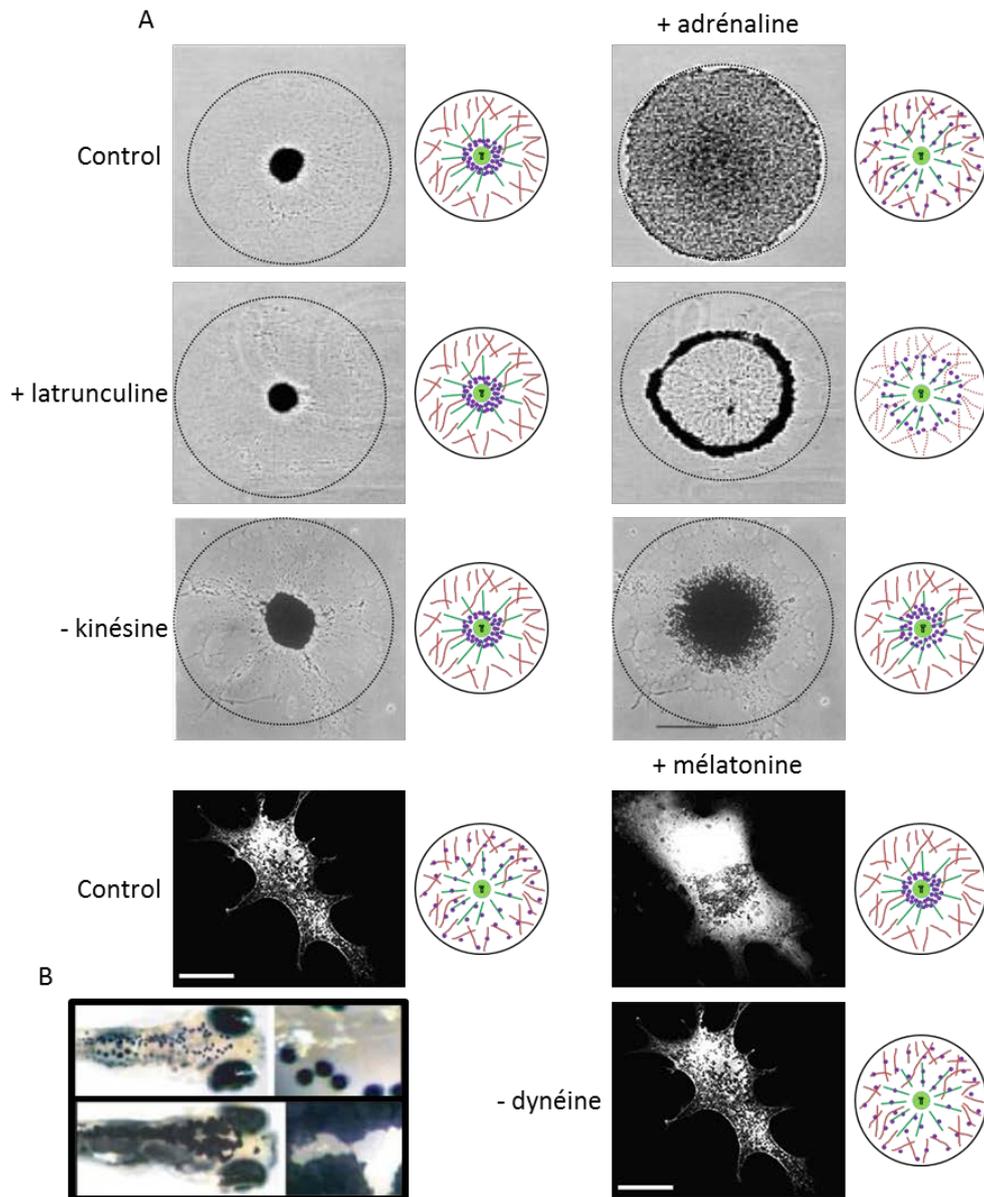


Figure 10 : Le mouvement des mélanosomes dans le mélanophore est dépendant du cytosquelette

L'adrénaline provoque la dispersion des mélanosomes dans le cytoplasme du mélanophore.

La présence de latrunculine, qui dépolymérise le cytosquelette d'actine (en orange), bloque partiellement la dispersion des mélanosomes qui n'atteignent pas le cortex de la cellule.

L'injection d'anticorps spécifiques altérant le fonctionnement de la kynésine, qui se déplace le long des microtubules (en vert), perturbe la dispersion des mélanosomes qui restent concentrés au centre de la cellule.

Lorsqu'ils sont dispersés, les mélanosomes retournent au centre de la cellule suite à un traitement par la mélatonine. La surexpression de la dynamitine, qui désintègre le complexe dynactine, perturbe le fonctionnement de la dynéine cytoplasmique, empêchant la concentration des mélanosomes en réponse à la mélatonine.

Barre d'échelle, 100 µm (vignettes du haut), 10 µm (vignettes du bas).

D'après Rodionov *et al.* 1991, Rodionov *et al.* 1997 et Reilein *et al.* 2003.

traitement à la latrunchuline avant le stimulus par l'adrénaline, les mélanosomes ne peuvent atteindre la périphérie de la cellule ce qui démontre le rôle joué par l'actine dans le déplacement des mélanosomes, au moins sur les derniers micromètres, leur permettant d'atteindre la périphérie de la cellule. Il existe des complexes protéiques particuliers, appelés moteurs moléculaires, capables de se déplacer le long des microtubules en utilisant l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP. Ces protéines ont souvent un sens de déplacement privilégié. Ainsi la kynésine conventionnelle se déplace vers l'extrémité (+) des microtubules et la dynéine cytoplasmique vers l'extrémité (-). Lorsque la fonction de la kynésine conventionnelle est altérée, par la microinjection d'anticorps spécifique, les mélanosomes ne bougent quasiment plus suite à un traitement à l'adrénaline et reste très proche du centre de la cellule (Rodionov *et al.*, 1991). A l'inverse, si c'est la fonction de la dynéine cytoplasmique qui est altérée, par la surexpression de la dynamitine, les mélanosomes une fois dispersés ne se reconcentrent pas suite à un traitement à la mélatonine (Reilein *et al.*, 2003). Ces observations révèlent le rôle joué par les microtubules dans le déplacement des compartiments membranaires et l'orientation de microtubules dans le cytoplasme de certaines cellules (ici les extrémités (+) sont dirigées vers la périphérie). Nous verrons plus tard à quel point l'organisation et les fonctions du réseau de microtubules sont intimement liées et dépendantes l'une de l'autre.

ii. Propriétés mécaniques et rôle morphogénétique du cytosquelette

Les fibres du cytosquelette peuvent être beaucoup plus rigides que ne le sont les membranes phospholipidiques. En effet les filaments intermédiaires ont une longueur de persistance d'un micron (Mucke *et al.*, 2004). De plus ils peuvent être étirés de plus de trois fois leur taille, ce qui fait d'eux les filaments les plus souples et élastiques du cytosquelette. L'actine quant-à-elle a une longueur de persistance de quelques dizaines de microns (Gittes *et*

	Longueur de persistance	Référence
ADN	≈ 35nm	Brinkers <i>et al.</i> , 2009
Filament intermédiaire	≈ 1μm	Mucke <i>et al.</i> , 2004
Filament d'actine	≈ 10μm	Gittes <i>et al.</i> , 1993
Microtubule	≈ 1mm	Gittes <i>et al.</i> , 1993
Spaghetti sec 21	≈ 10 ²⁰ m (estimé d'après)	Guinea <i>et al.</i> , 2004

al., 1993), elle aussi résiste bien aux extensions mais peu aux compressions. Toutefois, lorsque les filaments d'actine s'organisent en réseau réticulé, la résistance du réseau aux compressions excède celle d'un filament isolé. Les microtubules ont, quant à eux, une longueur de persistance de plusieurs millimètres (Gittes *et al.*, 1993), ce qui excède la taille de certaines cellules, faisant de ces polymères complexes les fibres les plus rigides du cytosquelette mais qui pourtant résistent assez mal aux extensions (Molecular Biology Of The Cell, 6^{ème} édition). Les propriétés des différentes fibres permettent au cytosquelette de jouer plusieurs rôles, il peut déformer les membranes ou bien au contraire les aider à résister à des déformations (Guinea *et al.*, 2004).

Il existe quelques cas bien documentés de déformation des membranes impliquant le cytosquelette, comme la formation des lamellipodes des cellules en migration ou des pseudopodes nécessaires à la phagocytose par exemple. Les lamellipodes sont des protrusions de la membrane plasmique qui dépendent de l'action mécanique, dirigée vers l'extérieur de la cellule, d'un réseau cortical très dense de filaments d'actine (Figure 11 B). Ils sont notamment impliqués dans la migration cellulaire en permettant à la cellule de former de nouveaux points focaux d'adhérence qui vont supporter la traction du reste de la cellule et ainsi son déplacement. Les pseudopodes sont également des protrusions membranaires dépendantes de la polymérisation, dirigée vers l'extérieur de la cellule, d'un réseau d'actine. Ils sont mis en place, notamment par les macrophages lorsque ceux-ci cherchent à phagocyter une particule reconnue comme étrangère. Les pseudopodes permettent la reconnaissance puis la traction de la particule vers l'intérieur de la cellule.

iii. Rôle dans la morphodynamique des compartiments membranaires

Dans les cellules eucaryotes, le réticulum endoplasmique est un compartiment membranaire complexe ayant une structure composée de saccules reliés entre eux par des tubules. Le réseau est très dynamique, des tubules sont créés et déplacés en permanence. Le rôle du cytosquelette, et plus particulièrement des microtubules, dans la formation des tubules de réticulum endoplasmique est connu. Il implique notamment le couple de protéines EB1 - STIM1. EB1 est une protéine associée préférentiellement à l'extrémité (+) des microtubules en polymérisation (Chapitre II 2), alors que STIM1 est une protéine membranaire, située sur la face externe de la membrane du réticulum. L'interaction de ces deux protéines permet la formation de tubules de réticulum (Figure 11 A) (Grigoriev *et al.*, 2008). En effet, la

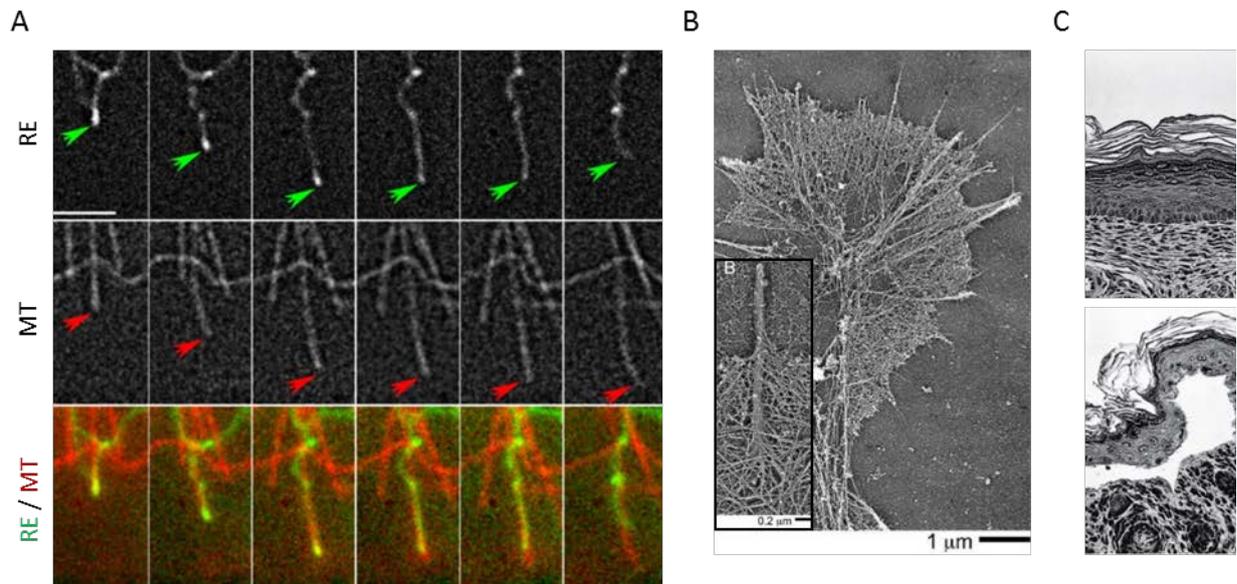


Figure 11 : Cytosquelette et déformation des membranes cellulaires.

(A) Un microtubule (MT) visualisé par l'incorporation de mCherry- α -tubuline génère une protrusion du réticulum endoplasmique (RE) visualisé par l'expression de GFP-STIM1 dans des cellules MRC5. Barre d'échelle, 3 μ m.

(B) Réseau de filaments d'actine dans un cône de croissance d'un neuroblastome de rat B35.

(C) Epidermolyse bulleuse (à droite), sur la peau d'une souris, causée par un défaut d'organisation des filaments intermédiaires du à l'expression d'une version mutée de la kératine.

Adapté de Grigoriev *et al.* 2008, Bornschl 2013 et Coulombe *et al.* 1991.

polymérisation du microtubule est capable, *via* l'interaction EB1 / STIM1, de tirer et/ou de pousser sur la membrane du réticulum, permettant ainsi l'émergence d'un tubule.

iv. Rôle dans l'établissement des propriétés mécaniques des cellules

Comme nous venons de le voir, de par leur grande rigidité comparée aux membranes phospholipidiques, les polymères du cytosquelette sont à même de déformer ces dernières pour permettre le fonctionnement cellulaire. L'organisation des filaments du cytosquelette et leur rigidité confère également à la cellule une partie de ses propriétés mécaniques. Ainsi lorsque le cytosquelette n'est pas un élément impliqué dans la déformation de la membrane, il peut être impliqué dans la résistance à cette déformation. En effet le rôle des filaments intermédiaires, en particulier des kératines, dans l'élasticité des épithéliums des mammifères est connu depuis longtemps. A titre d'exemple, chez des patients souffrant d'une épidermolyse bulleuse, les filaments de kératines sont désorganisés en raison de l'expression de kératines mutées. Les cellules épithéliales affectées ne sont alors plus à même de résister aux stress mécaniques et cèdent lors de ces stimulations, causant l'apparition de bulles sous la peau (Figure 11 C). De plus, il a été démontré expérimentalement que les propriétés mécaniques de cellules isolées de plantes ou de mammifères étaient modifiées lorsque le cytosquelette d'actine ou de microtubules était détruit par l'application de drogues. Ainsi les propriétés mécaniques des cellules animales semblent dépendre principalement de leur cytosquelette d'actine alors que celles des protoplastes (cellules végétales sans paroi) semblent dépendre plutôt du réseau de microtubules (Durand-Smet *et al.*, 2014). En sus de l'effet dû à leur simple présence, dans les cellules végétales, les microtubules sont impliqués dans la synthèse de la paroi cellulaire. En effet, les cellules végétales sont entourées d'une paroi cellulaire rigide composée principalement de polymères de sucres pontés par différents composés (extansines, pectines, lignine). Cette paroi confère aux cellules végétales un cadre rigide, capable de résister aux pressions élevées générées par la turgescence des cellules. La rigidité conférée aux cellules végétales par la paroi permet aux plantes de s'ériger contre la gravité et de dépasser de plusieurs ordres de grandeur la rigidité d'une cellule sans paroi (protoplaste). Les enzymes synthétisant les chaînes de cellulose, le principal constituant des parois cellulaires végétales, se déplacent le long des microtubules. Lorsque l'organisation du réseau cortical de microtubules est modifiée, comme par exemple chez des mutants de protéines associées au cytosquelette, alors l'organisation de la paroi est également modifiée puisque les fibres de cellulose ne sont plus « tissées » dans la bonne directions ce qui peut

modifier les propriétés mécaniques des cellules et tissus végétaux impactés. Le cytosquelette est donc impliqué dans l'établissement des propriétés mécaniques des cellules animales et végétales de multiples façons.

2) Les propriétés architecturales et dynamiques des microtubules.

a) Structure – Organisation moléculaire

Les microtubules sont des tubes creux de 25 nm de diamètre, résultat de la polymérisation des dimères de tubulines. En effet, les parois des microtubules sont formées par une dizaine de protofilaments associés latéralement pour former un tube (Figure 12 A). Comme nous l'avons vu précédemment, les microtubules sont polarisés ; les dimères de tubulines α/β sont tous dans la même orientation au sein des protofilaments et les protofilaments sont, eux aussi, tous dans la même orientation. La tubuline α d'un protofilament côtoie la tubuline α du protofilament adjacent. Il en est de même pour la tubuline β . Cependant, l'association latérale des protofilaments, qui a lieu entre tubulines de même type, se fait avec un léger décalage ce qui fait que les dimères de tubulines d'un protofilament ne sont pas parfaitement alignés avec ceux des protofilaments adjacents. Le résultat de ce décalage après un tour complet de microtubule est une rupture de la symétrie axiale attendue pour un tube. L'association latérale entre protofilaments se fait donc entre tubuline de même type sauf parfois au niveau d'une discontinuité où l'association latérale se fait entre tubulines différentes (Figure 12 B). C'est le cas d'un microtubule 13-3 ; qui possède 13 protofilaments et le dimère 3 du protofilament 1 est associé au dimère 1 du dernier filament. Dans ce microtubule, si l'on suit les premiers dimères de chaque protofilament, ils ne forment pas un anneau mais une hélice ayant un pas de 3 dimères. On dit d'un microtubule 13-3 qu'il a treize protofilaments et trois hélices latérales.

Le nombre de protofilament dans un microtubule n'est pas fixé, d'après la littérature il peut varier de 8 à 17 *in vitro* (Hunyadi *et al.*, 2005). De la même façon, le décalage entre un protofilament et le suivant n'est pas toujours le même, il peut y avoir de 2 à 6 hélices latérales. Pourtant, l'unité de base pour bâtir toutes ces configurations différentes est la même de sorte que chacune de ces configurations induit plus ou moins de contraintes mécaniques dans la structure du microtubule. Ces contraintes se traduisent par une accumulation plus ou moins importante d'énergie élastique dans la structure. De ce fait, les différentes configurations ne sont pas toutes aussi stables les unes que les autres. Ainsi, d'après Hunyadi *et al.*, 2005, les formes 12-3, 13-3 et 14-3 sont les configurations les plus stables et donc celles retrouvées le plus souvent *in vitro* (dans les conditions de l'étude). La stabilité de la forme 13-3 comparée aux autres configurations explique probablement également sa

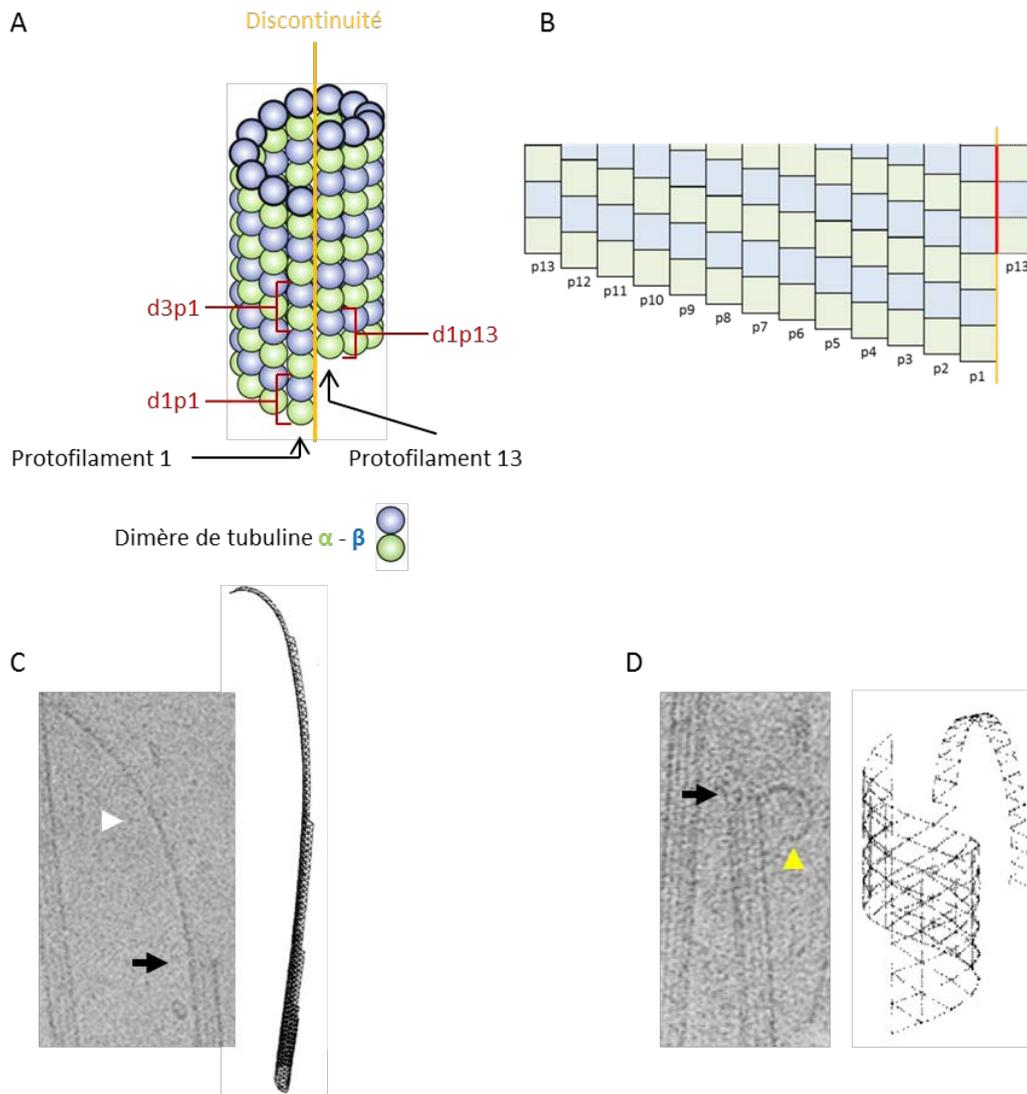


Figure 12 : Organisation moléculaire d'un microtubule.

(A) Une microtubule constitué de 13 protofilaments et 3 hélices latérales présente une discontinuité entre les protofilaments 13 et 1. D'après Zhang et Nogales 2015.

(B) L'interaction latérale entre protofilaments se fait entre tubulines de même type du filament 1 au filament 13. La discontinuité apparait entre le protofilament 13 et le protofilament 1, à cette endroit les interactions latérales se font entre tubulines différentes (ligne rouge).

(C) L'extrémité (+) du microtubule en polymérisation. Un nombre restreint de protofilaments forment un feuillet à l'extrémité du microtubule (flèche blanche). Ce feuillet présente une courbe longitudinale provenant de la courbure intrinsèque des protofilaments et une courbure latérale résultat de l'interaction entre protofilaments. La courbure latérale augmente avec le nombre de protofilaments jusqu'à la formation d'un tube (flèche noire).

D'après Chrétien et Flyvbjerg, 1999.

(D) L'extrémité (+) du microtubule en dépolymérisation. Lors de la dépolymérisation les interactions latérales entre protofilaments disparaissent, les protofilaments se courbent vers l'extérieur et dépolymérisent (flèche jaune).

D'après Chrétien et Flyvbjerg, 1999.

surabondance *in vivo*. Toutefois les formes moins stables ne sont pas impossibles à obtenir et des microtubules en 8-2 ou 17-2 ont été observés *in vitro*. De plus, dans une cellule, il est possible que certaines protéines/molécules, en modifiant la stabilité des microtubules, modifient l'éventail des configurations possibles ; un effet stabilisant augmentera la probabilité de voir des polymères aux configurations moins favorables se former alors qu'un effet déstabilisant rendra ces formes plus rares. De plus, le site d'interaction de certaines protéines avec le microtubule est situé à l'interface entre deux sous-unités ou entre deux protofilaments de sorte que ces protéines puissent, lorsqu'elles sont associées au microtubule modifier localement sa structure. Enfin, on peut noter que suivant le nombre de protofilaments et d'hélices latérales, la discontinuité décrite précédemment peut ne pas exister.

L'extrémité (+) des microtubules, celle qui polymérise le plus vite, présente deux structures très différentes en fonctions de son état cinétique. Lors de la polymérisation, les dimères de tubulines ne sont pas ajoutés de façon hélicoïdale à l'extrémité du microtubule. En effet, les observations effectuées sur des microtubules polymérisés *in vitro* en cryo-microscopie électronique révèlent une structure allongée et courbée présente à l'extrémité (+) en polymérisation. Ce feuillet est formé par quelques protofilaments, plus longs que les autres, associés latéralement et courbés vers l'extérieur du tube. Il présente donc une double courbure, celle du tube (courbure latérale) et celle vers l'extérieur (courbure longitudinale) (Figure 12 C). Le nombre de protofilaments augmente dans le feuillet le long de celui-ci jusqu'à l'endroit où le feuillet compte suffisamment de protofilament pour se refermer en un tube. La taille du feuillet dépend de la vitesse de polymérisation du microtubule, plus la croissance de ce dernier est rapide plus le feuillet est long. Lors de la dépolymérisation, les associations latérales entre protofilaments sont rompues, les protofilaments retrouvent une forme courbée vers l'extérieur, cohérente avec la structure légèrement courbe des sous unités solubles. La courbure de ces protofilaments est plus prononcée que celle du feuillet. Les protofilaments se séparent latéralement les uns des autres et les sous-unités s'en dissocient (Figure 12 D).

b) L'instabilité dynamique

i. Une propriété intrinsèque des microtubules

De façon similaire à l'actine, dès qu'il a été possible de purifier de la tubuline (sous forme de dimères) et de faire polymériser des microtubules *in vitro*, l'assemblage des tubulines en microtubule a pu être étudié plus en détails. A une certaine concentration de tubulines dans un tampon contenant du GTP, les dimères de tubulines vont former des microtubules. La formation du polymère à partir des sous unités solubles n'est pas immédiate et présente, à l'instar de l'actine, une étape de nucléation, énergétiquement défavorable, pour passer de dimères solubles à un microtubule. Cependant, contrairement à l'actine, la forme/structure des noyaux de nucléation n'est pas claire dans ce cas précis. Il pourrait s'agir de petits feuilletts légèrement courbes, ressemblant à ceux présents à l'extrémité (+) en polymérisation (Moore *et al.*, 2006). Dans tous les cas, leur formation est chronophage, ce qui explique la phase de latence. Ensuite, les microtubules polymérisent par l'ajout de tubulines libres aux noyaux de nucléation (phase d'élongation) jusqu'à ce qu'un plateau soit atteint (phase stationnaire). Les microtubules étant polarisés, les deux extrémités n'ont pas les mêmes vitesses de polymérisation ; l'extrémité (+), exposant la tubuline β croît plus vite que celle exposant la tubuline α , notée extrémité (-). Une concentration critique de tubuline peut être définie (de la même façon que pour l'actine) pour chacune des extrémités. Toutefois, l'extrémité (-) est beaucoup moins bien décrite que l'extrémité (+). En effet, sa vitesse de polymérisation faible rend son étude délicate en augmentant la durée des expériences et la plupart des études ont été faites en présence de noyaux de nucléations, pour réduire la phase de latence, or ces noyaux ont souvent été des centrosomes dans lesquels l'extrémité (-) est ancrée et stabilisée. *In vivo*, l'étude de la dynamique des extrémités (-) est également compliquée du fait de leur stabilisation par un grand nombre de facteurs.

L'extrémité (+) des microtubules ne fait pas que croître. Le microtubule est soumis à des phases de croissance suivies de phases de dépolymérisation lors desquelles les dimères de tubulines se détachent de la structure. Les vitesses auxquelles se déplacent les extrémités (+) lors de la polymérisation et de la dépolymérisation du microtubule sont définies comme étant les vitesses de polymérisation (V_{pol}) et de dépolymérisation (V_{depol}) respectivement. Les événements de transitions entre ces phases sont appelés catastrophe et sauvetage. Une catastrophe étant l'évènement lors duquel une extrémité (+) en croissance cesse de croître et

se met à dépolymériser. Lorsque c'est le cas, la structure de l'extrémité change, le feuillet décrit précédemment disparaît et les protofilaments du microtubule s'épluchent (voir Figure 13) (Mandelkow et Mandelkow, 1985). Réciproquement, lors d'un événement de sauvetage, le microtubule en phase de dépolymérisation se remet à polymériser. Les fréquences de ces événements de transition sont notées respectivement F_{cat} et F_{sau} . Ces quatre paramètres (les vitesses de polymérisation et de dépolymérisation et les deux fréquences de transitions) permettent de décrire le comportement d'un microtubule ou d'une population de microtubules. Bien que ces événements de transitions aient été observés depuis fort longtemps, les mécanismes expliquant leur occurrence ne sont pas complètement compris. Deux modèles de travail décrits ci-après permettent de mieux cerner les mécanismes en jeu.

ii. La coiffe GTP

La tubuline est une GTP-ase. Cependant, comme nous l'avons vu en première partie, lors de la formation du dimère, le site de liaison de la tubuline- α est bloqué et le GTP qui y est lié ne peut être ni hydrolysé ni échangé. En revanche, la tubuline β est capable d'hydrolyser le GTP, mais comme décrit pour l'hydrolyse de l'ATP pour l'actine, l'hydrolyse du GTP par un hétérodimère de tubuline soluble est très limitée. Lors de la polymérisation en microtubules, la proximité entre dimères permet à la tubuline α d'un dimère d'un protofilament d'activer l'hydrolyse du GTP de la tubuline β du dimère placé juste avant lui (activité GTPase Activating Protein). Cependant cet événement n'est pas immédiat et n'a pas lieu dès l'incorporation. Le décalage temporel, entre le moment de l'incorporation d'un dimère et l'hydrolyse de son GTP, permet l'existence d'une population de dimère GTP à l'extrémité (+) du microtubule. Or, comme pour l'actine, la forme GTP est beaucoup plus affine pour le polymère que la forme GDP qui a tendance à se désolidariser du polymère. La différence d'affinité pouvant provenir d'une légère modification de la forme du dimère après l'hydrolyse du GTP (Desai et Mitchison, 1997). Ainsi, la présence de cette coiffe GTP protégerait l'extrémité (+) de la dépolymérisation. Toutefois, l'existence de cette coiffe dépend de la vitesse de polymérisation et de la vitesse à laquelle le GTP est hydrolysé après le recrutement d'un hétérodimère. En effet, lorsqu'un dimère est ajouté à l'extrémité, si le temps nécessaire à l'hydrolyse est plus long que le temps nécessaire à l'ajout d'un autre dimère, c'est-à-dire si la vitesse de polymérisation excède la vitesse d'hydrolyse, la coiffe GTP peut se maintenir à l'extrémité du microtubule. C'est le cas lorsque le microtubule croît rapidement. A l'inverse, lorsque la vitesse de polymérisation devient inférieure à la vitesse d'hydrolyse, la coiffe finit

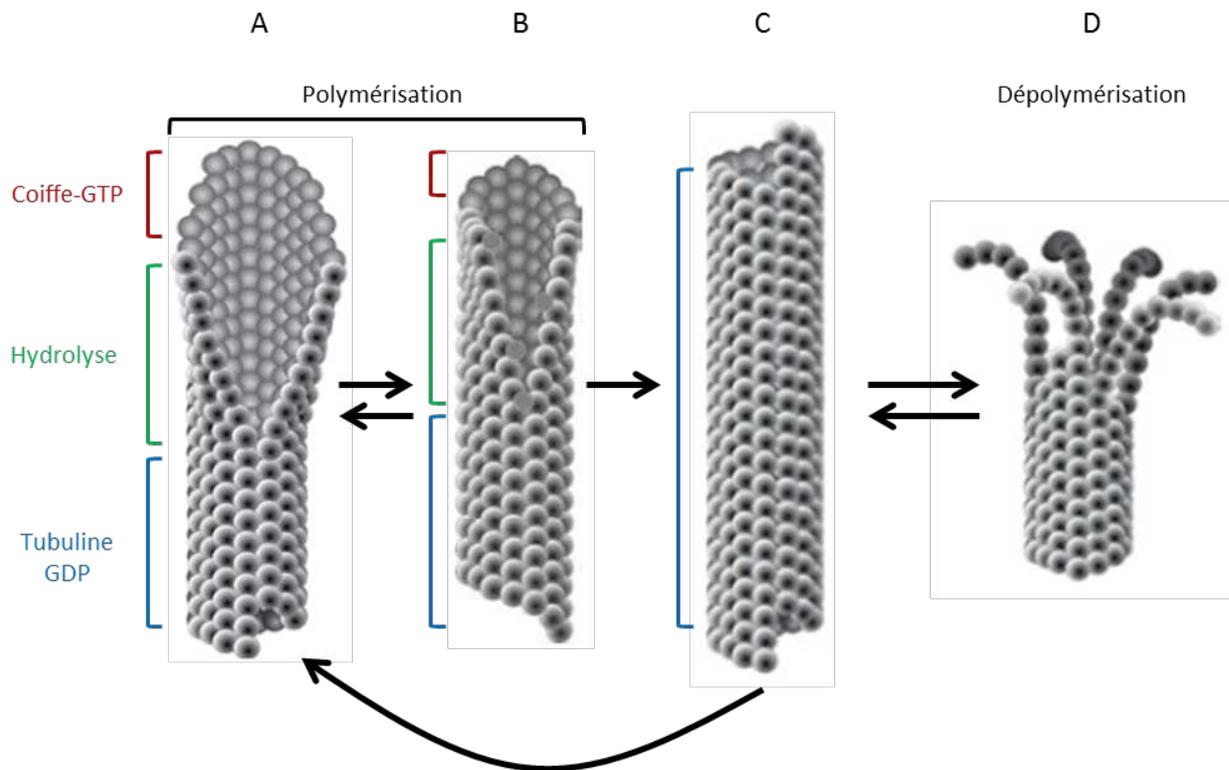


Figure 13 : Instabilité dynamique des microtubules.

(A) Le microtubule en polymérisation présente à son extrémité (+) une coiffe de tubuline GTP et un feuillet de protofilaments.

(B) La zone d'hydrolyse du GTP coïncide avec la fermeture du feuillet de protofilament en un tube (Guesdon *et al.*, sous presse).

(C) Lorsque le feuillet de microtubule et la coiffe GTP disparaissent le microtubule ne polymérise plus. La polymérisation peut reprendre si un feuillet se forme de nouveau sinon l'énergie mécanique contenue dans le tube peut se libérer, provoquant une catastrophe et faisant dépolymériser le microtubule (D).

(D) Lors d'une dépolymérisation les liaisons latérales entre protofilaments cèdent, ils se courbent vers l'extérieur et les dimères se s'individualisent.

D'après Vitre *et al.* 2008, Coquelle *et al.* 2009.

par disparaître, ce qui provoquerait un évènement de catastrophe. La dépolymérisation correspond au relâchement de l'énergie élastique accumulée dans la structure au cours de la polymérisation. La disparition complète du polymère lors d'une dépolymérisation semble donc inévitable. Pourtant, des évènements de « sauvetage » ont été observés, ces évènements voient un microtubule basculé d'une phase de dépolymérisation à une phase de polymérisation. Pour expliquer l'existence de ces évènements, il a été proposé qu'ils aient lieu au niveau d'îlots de tubuline-GTP. Ces îlots seraient des reliquats de tubuline-GTP présent dans le corps des microtubules. Ils pourraient provenir d'une hydrolyse incomplète au moment de la polymérisation, notamment lorsque celle-ci est intense. La tubuline-GTP étant plus affine pour le polymère, ces îlots seraient résistant à la dépolymérisation et permettraient un évènement de sauvetage. Un argument expérimental est venu appuyer cette hypothèse lorsqu'un anticorps dirigé contre la tubuline-GTP a reconnu des sites situés dans le corps des microtubules ou avait eu lieu un sauvetage, suggérant un lien entre îlots de tubuline-GTP reconnus par l'anticorps et sauvetage lors d'une dépolymérisation (Dimitrov *et al.*, 2008). De plus, il semble que ces îlots de tubuline GTP puissent être des sites de recrutement de protéines associées aux microtubules et impliquées dans les évènements de sauvetage.

iii. La coiffe conformationnelle

L'hydrolyse du GTP de la tubuline β a lieu dans le microtubule, la tubuline soluble l'hydrolysant très lentement. Pourtant, de la tubuline contenant un analogue très lentement hydrolysable du GTP parvient à former des microtubules dans des conditions permettant la polymérisation de la tubuline GTP. L'hydrolyse du GTP n'est donc pas nécessaire à la formation des microtubules mais semble être une conséquence de la polymérisation des dimères de tubulines. En effet, dans la paroi du microtubule les dimères de tubulines adoptent une structure légèrement différente de celle qu'ils ont lorsqu'ils sont solubles. Les dimères ont une structure plutôt « courbe » lorsqu'ils sont solubles ou dans le feuillet à l'extrémité (+). Lors de la fermeture du feuillet en tube, les dimères passent d'une conformation « courbe » à une conformation plutôt « droite ». Ce changement de conformation pourrait être à l'origine de l'hydrolyse du GTP (Guesdon *et al.*, 2016). De plus, la structure des dimères solubles étant plutôt « courbe », le « redressement » des dimères lors de la fermeture du feuillet entraîne l'accumulation d'énergie élastique dans le microtubule. De ce fait, les sous unités dans le feuillet semblent être dans un état énergétique plus favorable que celles dans le tube, de sorte que le feuillet puisse agir comme une structure stabilisatrice à l'extrémité du microtubule

(Hunyadi *et al.*, 2005). Lorsque cette « coiffe conformationnelle » viendrait à disparaître, le microtubule serait plus prompt à partir en catastrophe.

L'instabilité dynamique des microtubules a été constatée très précocement (Mitchison et Kirschner, 1984), toutefois les mécanismes expliquant les changements stochastiques d'état de l'extrémité (+) ne sont pas clairement explicités. La coiffe GTP et la coiffe conformationnelle sont deux hypothèses de travail, non mutuellement exclusives, permettant de rendre compte de ce qui a été observé d'un point de vue biochimique et d'un point de vue structural. Un fait remarquable à propos de ces deux modèles vient du fait que le « corps » du microtubule, de nature très instable, est peu impliqué dans la stabilité du polymère. Sa stabilité apparente lui est conférée principalement par ce qu'il se passe à son extrémité (structure et/ou état biochimique).

Dans la partie suivante, nous verrons qu'à partir de ces polymères dynamiques, la cellule arrive à former différents réseaux lui permettant d'accomplir ces fonctions. Nous discuterons de l'importance de cette dynamique pour la formation de ces réseaux. Nous découvrirons que l'instabilité dynamique des microtubules, bien qu'étant une propriété intrinsèque, peut être modifiée par certaines protéines et nous présenterons les mécanismes permettant à certaines de ces protéines de modifier l'instabilité dynamique des microtubules et subséquemment l'organisation tridimensionnelle de leurs réseaux.

II. Les facteurs qui régulent l'instabilité dynamique et l'organisation du réseau de microtubules.

1) Un même filament, plusieurs organisations pour plusieurs fonctions

Dans les cellules eucaryotes, le réseau de microtubules est, en général, organisé depuis un centre organisateur de microtubules (COMT) comme le centrosome. Le centrosome est constitué d'un couple de centrioles orthogonaux. Un centriole est une structure tubulaire formée par 9 triplets de microtubules. Les deux centrioles sont entourés de nombreuses protéines formant ce que l'on appelle le matériel péricentriolaire, les deux centrioles et le matériel péricentriolaire formant le centrosome (Chretien *et al.*, 1997). Le centrosome est le lieu de nucléation de la plupart des microtubules et protège les extrémités (-) qui y sont ancrées, contribuant ainsi à l'organisation du réseau microtubulaire dans son ensemble. Toutefois, certaines cellules sont dépourvues de centrosomes, comme les ovocytes de mammifères et la plupart des cellules végétales (à l'exception notable des algues vertes du genre *Chlamydomonas*). De plus, dans certains types cellulaires qui possèdent un centrosome, tous les microtubules n'y sont pas ancrés, comme dans les cellules épithéliales très différenciées, dans lesquelles une population de microtubules traverse le cytosol de part en part. Pourtant, toutes ces cellules ont un réseau de microtubules organisé et leur fonctionnement en dépend très largement. Cela démontre la variété des moyens trouvés par les cellules pour organiser leur réseau de microtubules.

a) Tour d'horizon des différents types de réseaux rencontrés chez les eucaryotes.

Suivant le moment du cycle cellulaire considéré, le type cellulaire choisi et l'organisme étudié, le réseau de microtubules peut présenter des organisations très différentes. Ainsi dans un fibroblaste le réseau de microtubules explore le volume cellulaire depuis le COMT. Le COMT est proche du centre de la cellule, à proximité du noyau (Figure 14 A). De là, les extrémités (+) des microtubules explorent le volume cellulaire tandis que les extrémités (-) sont ancrées dans le COMT. Ce réseau soutient notamment l'organisation du cytoplasme en permettant le positionnement et le mouvement des organites.

Dans une cellule végétale en croissance, du fait de l'occupation de la majorité de l'espace intracellulaire par la vacuole et de l'absence d'un COMT clairement localisé, le

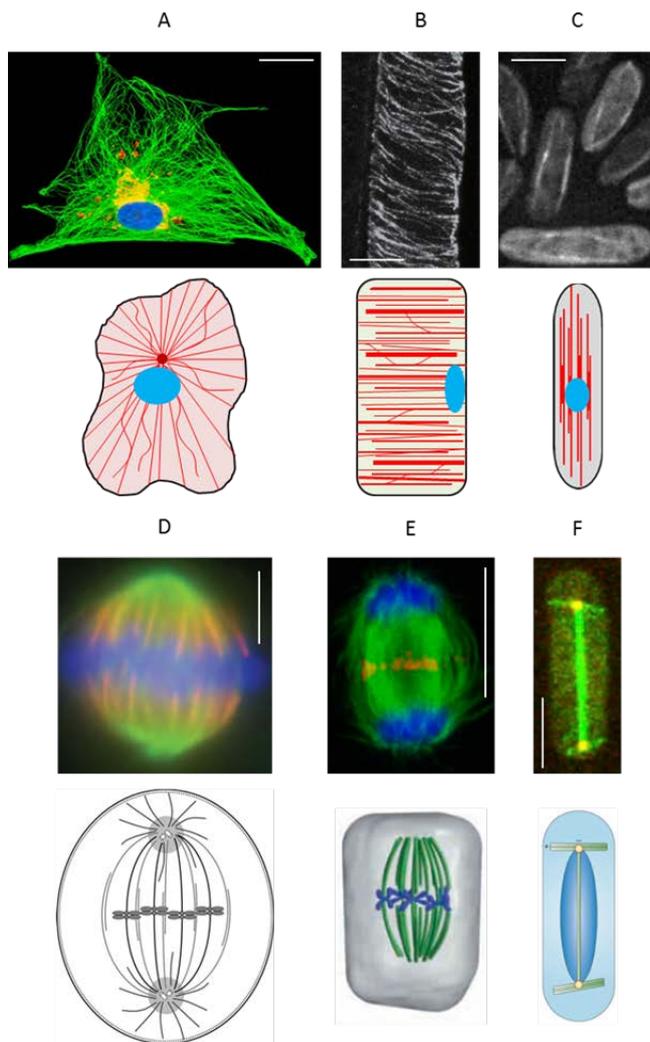
réseau de microtubules est cortical. Dans ce réseau cortical, les microtubules sont le plus souvent organisés en faisceaux parallèles, à quelques dizaines de nanomètres de la membrane plasmique (20 nm environ) (Figure 14 B). Ce réseau est impliqué dans la synthèse de la paroi cellulaire en participant au mouvement puis au positionnement des enzymes qui la sécrètent. L'interaction du réseau de microtubules avec, d'une part, le réseau endomembranaire et, d'autre part les enzymes de sécrétion de la paroi en fait un acteur essentiel de la croissance cellulaire, notamment dans les cellules à croissance apicale telle que les poils racinaires (Sieberer *et al.*, 2005) ou le tube pollinique (Fu, 2015).

Chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), le réseau, qui ne contient que quelques dizaines de microtubules, se résume à quelques faisceaux de microtubules antiparallèles traversant la cellule de part en part (Figure 14 C). Ce réseau de microtubules est organisé à partir d'un COMT particulier appelé le SPB (Spindle Pole Body), qui ne contient pas de centriole et qui est associé à l'enveloppe nucléaire. Dans ce réseau, les microtubules sont impliqués notamment dans la polarisation de la cellule et la définition de son axe de croissance en permettant l'adressage de différentes protéines aux extrémités de la cellule.

Bien que les réseaux aient des organisations différentes en interphase, un fuseau mitotique semble toujours se former au cours de la division cellulaire, quel que soit le règne ou le type cellulaire concerné (Figure 14 D, E et F). En effet, à cette étape, une cellule mère se divise en deux cellules filles en répartissant équitablement son contenu en ADN. Le fuseau de division est un édifice moléculaire complexe et transitoire contenant des microtubules dont la dynamique est étroitement régulée au cours du processus mitotique. Sa fonction essentielle est d'assurer la ségrégation précise et équitable des chromosomes entre les deux cellules filles.

Dans le règne animal, le centrosome est dupliqué avant l'entrée de la cellule en mitose (au cours des phases G2 et S). Chaque centrosome constitue ainsi un pôle du fuseau mitotique contribuant à focaliser les extrémités (-) des microtubules et à contrôler leur dynamique. En l'absence de centrosome, le fuseau mitotique des cellules végétales présente la même structure globale que dans les cellules animales, à ceci près que les pôles sont moins focalisés, moins « pointus » (Figure 14). Chez *S. pombe*, il n'y a pas de rupture de l'enveloppe nucléaire comme chez les autres eucaryotes. De ce fait, le fuseau mitotique est dans le noyau et ses pôles sont focalisés au niveau des SPB.

Figure 14 : Organisation du réseau de microtubules pendant l'interphase et la division cellulaire chez les mammifères, les plantes supérieures et la levure *S. pombe*.



(A) Les microtubules (en vert), l'appareil de Golgi (en rouge) et le noyau (en bleu) sont visualisés par immunofluorescence dans un fibroblaste de derme de cheval (NBL-6). Barre d'échelle 10 μ m.

Crédit : /micro.magnet.fsu.edu.

(B) Réseau cortical de microtubule dans une cellule en élancement de l'épiderme de racine d'*Arabidopsis thaliana* de 10 jours visualisé par immunofluorescence. Barre d'échelle 10 μ m. Ishida *et al.*, 2007.

(C) Réseau de microtubules dans une cellule de levure *Schizosaccharomyces pombe*, exprimant de la CFP-tubuline. Barre d'échelle 5 μ m. Bratman et Chang 2007.

(D) Fuseau mitotique dans une cellule HeLa en métaphase. Les microtubules (vert), les kinetochores (bleu) et la protéine HURP (rouge) visualisés par immunofluorescence. Barre d'échelle, 5 μ m. Sauer *et al.*, 2005. Schéma de l'organisation du fuseau mitotique. Goodman et Zheng 2006.

(E) Fuseau mitotique en anaphase tardive dans une cellule d'*Arabidopsis* en suspension. Les microtubules (vert), l'ADN (en bleu) et la protéine MAP65-5 (en rouge) sont visualisés par immunofluorescence. Barre d'échelle, 5 μ m. Smertenko *et al.*, 2008. Schéma de l'organisation du fuseau mitotique chez *Arabidopsis*. Wasteneys 2002.

(F) Réseau de microtubules dans une cellule de levure *Schizosaccharomyces pombe* en anaphase. Les microtubules (en vert) sont visualisés par l'expression de la protéine GFP-Atb2. En rouge la protéine sid2-Tom. Barre d'échelle, 5 μ m. Lucena *et al.*, 2015. Schéma de l'organisation du fuseau mitotique chez *S.pombe* en anaphase. Gladfelter et Berman 2009

Quelle que soit leur organisation, ces fuseaux ont pour fonction de séparer les chromatides sœurs des chromosomes et de les répartir entre les deux futures cellules filles. Pour ce faire, les microtubules interagissent avec les chromosomes au niveau de leurs centromères *via* un organite particulier, le kinétochore. Le kinétochore est une structure trilaminaire contenant de nombreuses protéines dont les fonctions sont d'assurer et de contrôler l'attachement de chaque chromatide à un pôle du fuseau mitotique. Cet attachement s'effectue grâce à l'ancrage dans la plaque externe du kinétochore d'un faisceau de plusieurs microtubules, appelé fibre kinétochorienne (fibre K), provenant de l'un des deux pôles. Cette fibre K va ainsi contribuer à séparer les chromatides sœurs en combinant l'action de moteurs moléculaires et la dynamique étroitement coordonnée des microtubules qui la composent.

Les axonèmes (structure se retrouvant à la base des cils et des flagelles) et les centrioles peuvent être considérés comme des réseaux hautement spécialisés et très conservés dans les différents règnes du vivant. Nous ne développerons pas ces aspects qui constituent des pans entiers de la littérature et sont très différents des réseaux étudiés au cours de cette thèse.

Ces quelques exemples illustrent l'importance du réseau de microtubules dans les fonctions cellulaires. Bien que dotés d'une architecture très différente d'un règne à l'autre, voire même d'une espèce à l'autre, ou d'un type cellulaire à l'autre, l'organisation et la dynamique de ces réseaux conditionnent très largement les processus cellulaires fondamentaux. De plus, les mécanismes qui permettent à la cellule de contrôler l'organisation et la dynamique du réseau de microtubules sont très conservés chez l'ensemble des eucaryotes comme nous allons le voir dans la suite de ce chapitre. Ils reposent essentiellement sur le modèle du « Search and Capture ».

b) Le modèle « Search and Capture »

Les microtubules sont dynamiques et passent sans cesse de phases de polymérisation en phases dépolymérisation et réciproquement. Pourtant, nous l'avons évoqué précédemment, le réseau de microtubules doit être organisé pour permettre à la cellule d'accomplir ses fonctions. L'organisation d'un réseau de microtubules doit être pérenne sur des intervalles de temps pouvant aller de quelques minutes à plusieurs jours voire même des années. Comment des filaments aussi dynamiques peuvent-ils être organisés dans une cellule pendant des lapses de temps aussi long ? Un modèle, imaginé il y a 30 ans par Marc W. Kirschner et Tim

Mitchison (Kirschner et Mitchison, 1986), réconcilie ces deux observations ; dynamique des filaments et stabilité de l'organisation du réseau. Ce modèle de la « Selective Stabilization », appelé plus tard, « Search and capture » est fondé sur (1) l'instabilité dynamique des extrémités (+) des microtubules qui leur permet d'explorer une nouvelle partie de l'espace après chaque sauvetage et (2) la capacité des microtubules à interagir avec différentes structures cellulaires (membrane plasmique, vésicules, chromosomes, ...). Le modèle repose sur la sélection de certains microtubules à partir d'une population dynamique. Il table sur le fait que certaines des interactions sont responsables de la stabilisation de certains microtubules au sein du réseau. Par exemple, lors de la migration cellulaire suite une blessure (expérience dite du « wound healing », Gotlieb *et al.*, 1981), le réseau de microtubules dans les cellules endothéliales jouxtant la « blessure » se polarise pour permettre la migration de ces cellules afin de clore la blessure. Dans ce réseau de microtubules dynamiques, on peut imaginer qu'un facteur présent au cortex cellulaire s'accumule du côté de la blessure et soit responsable de la stabilisation des microtubules dans cette direction. Tout en étant dynamiques, les microtubules qui seraient capables d'atteindre ce côté du cortex cellulaire se retrouveraient stabilisés par leur interaction avec ce facteur. Suivant ce modèle, la localisation d'une « cible » par un filament est plus efficace si le filament est soumis à une instabilité dynamique plutôt qu'une simple polymérisation. En effet, des modélisations tendent à montrer que, si la distance entre le site de nucléation et la « cible » est de l'ordre de grandeur de la taille moyenne des polymères, un microtubule soumis à l'instabilité dynamique, atteint sa cible en un temps généralement 1000 fois plus court qu'un simple polymère (Holy et Leibler, 1994). Ce résultat démontre : (1) l'intérêt pour la cellule d'avoir un réseau de filaments aussi dynamique que les microtubules ; (2) l'efficacité du « Search and Capture » pour faire atteindre une cible aux microtubules ; (3) qu'un réseau dynamique peut changer d'organisation et la maintenir dans le temps.

Toutefois, ce modèle exige une interaction de l'extrémité (+) des microtubules avec un facteur stabilisateur, souvent situé à proximité d'une membrane (ou kinétochore par ex) et polarisant le réseau. Or, il faut que les microtubules soit capables d'interagir avec le facteur / la structure en question. Nous verrons donc par la suite qu'il existe de nombreuses protéines capables d'interagir avec l'extrémité (+) des microtubules et de modifier les paramètres de l'instabilité dynamique.

2) Les facteurs qui régulent la dynamique des microtubules.

a) Les MAP, généralités

L'instabilité dynamique des microtubules, évoquée plus haut, est un acteur essentiel de la mise en place et du maintien d'un réseau de microtubules. C'est, en effet, cette propriété intrinsèque des microtubules qui permet à la cellule d'assembler un fuseau mitotique fonctionnel à partir d'un réseau interphasique. Il en est de même lors de la polarisation des microtubules de fibroblastes ou d'astrocytes en migration (Gundersen et Bulinski, 1988, Etienne-Manneville, 2013), ou bien de la réorientation du réseau cortical de microtubules de la cellule épidermique d'*Arabidopsis thaliana* qui a cessé de croître (Wasteneys, 2002). Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre précédent, l'instabilité dynamique est une propriété intrinsèque des microtubules qui résulte de la combinaison :

- de l'association de la tubuline avec un nucléotide
- de la capacité de la tubuline à hydrolyser le GTP suite son incorporation dans le microtubule
- du changement de conformation des dimères induit par la polymérisation en microtubule
- de la différence d'affinité pour le polymère existant entre les dimères de tubulines GTP et GDP.

Toutefois, bien qu'intrinsèque, l'instabilité dynamique des microtubules est finement régulée dans la cellule, dans le temps et dans l'espace, par une myriade de facteurs associés aux microtubules que nous avons coutume de nommer MAP (Microtubules-Associated Proteins).

Toutes les MAP sont associées aux microtubules mais on peut définir deux « sous catégories » en fonction de son site précis d'interaction avec le microtubule. En effet, le microtubule peut être divisé en plusieurs domaine d'interaction ayant des structures différentes : l'extrémité (+), le corps du microtubule et l'extrémité (-). Certaines protéines ne se lient qu'au corps du microtubule comme MAP2 et TAU (Kim *et al.*, 1979, Weingarten *et al.*, 1975) d'autres sont quasi exclusivement recrutées aux extrémités. Comme indiqué précédemment, la structure de l'extrémité (+) n'est pas la même lors de la polymérisation et de la dépolymérisation. Ainsi certaines protéines ne se lient à l'extrémité (+) que lorsque celle-ci est en phase de croissance, ce sont les + TIP (+ End Tracking Protein) dont la CLIP-170 et EB1 sont les prototypes (voir plus loin) (Schuyler et Pellman, 2001). Il existe une grande variété de protéines capables d'interagir avec les microtubules à un moment donné, de

façon directe ou bien indirecte. En effet, une interaction avec un microtubule peut être autonome, lorsque la protéine possède un domaine d'interaction avec les microtubules, ou bien non-autonome, ce qui implique un recrutement *via* une autre protéine qui, elle, possède un domaine de liaison aux microtubules (Figure 15 A). Ainsi, le nombre de MAP identifiées jusqu'à aujourd'hui est très important mais, parmi ces protéines, rares sont celles dont on a fait la preuve d'un recrutement autonome. Ce constat est particulièrement vrai pour les +TIP. La définition est d'abord fondée sur la localisation de la protéine à l'extrémité (+) des microtubules en croissance (Bieling *et al.*, 2007). Cette localisation, souvent observée grâce à une fusion transcriptionnelle avec une protéine fluorescente, ne dit rien de l'interaction (Figure 15 B). Néanmoins, quel que soit le mécanisme par lequel les MAP et les +TIP se retrouvent associées aux microtubules, elles contribuent toutes à moduler les paramètres de l'instabilité dynamique et/ou l'organisation des réseaux, directement ou indirectement, comme nous allons le voir dans la section suivante.

b) Facteurs stabilisateurs et déstabilisateurs

L'étude de l'effet d'une MAP sur la dynamique des microtubules *in vivo* est compliquée du fait du grand nombre de protéines susceptibles d'interagir avec les microtubules dans ce contexte et de la capacité de cette MAP à recruter d'autres protéines ou à être recrutée par d'autres protéines sur les microtubules. Ainsi, lors de la surexpression ou de la « déplétion » d'une MAP dans un contexte cellulaire, si une modification de l'instabilité dynamique est constatée, il est souvent difficile d'attribuer l'effet aux propriétés intrinsèques de la protéine testée plutôt qu'à une modification du réseau de MAP associés aux microtubules. Réciproquement, les résultats obtenus lors d'expérience en systèmes purifiés ne peuvent, eux non plus, rendre totalement compte de ce qu'il se passe dans une cellule, notamment de la complexité du milieu réactionnel. Dans cette partie, nous illustrerons l'effet de différentes MAP sur la dynamique des microtubules en combinant les résultats obtenus *in vivo* et *in vitro*.

Les MAP peuvent être rangées dans trois catégories suivant leur effet sur la dynamique des microtubules. Elles peuvent avoir un effet stabilisateur ou déstabilisateur et/ou bien promouvoir la dynamique. La stabilisation peut être une conséquence de l'augmentation de la fréquence de sauvetage et/ou de la diminution de la fréquence de catastrophe, ces deux effets étant très souvent combinés à l'augmentation de la vitesse de polymérisation et/ou à la

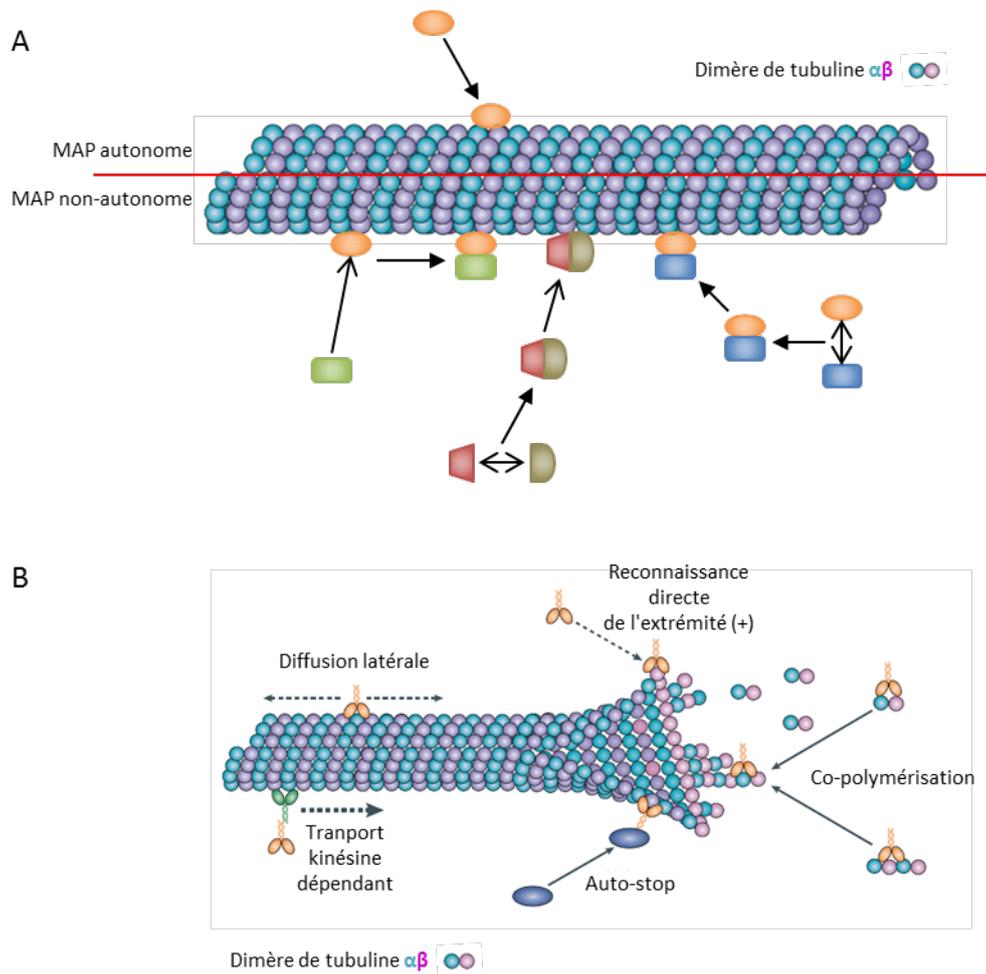


Figure 15 : Mécanismes possibles d'associations des MAP et des +TIP avec les microtubules.

(A) Les MAP (Microtubule-Associated Protein) sont associées avec les microtubules. Cette association avec les microtubules peut se faire de façon autonome si la protéine possède un domaine de liaison avec les microtubules. Lorsque la protéine ne possède pas de domaine de liaison avec les microtubules son association avec eux dépend d'un intermédiaire.

(B) Les +TIP (+ End Tracking Protein) sont localisées à l'extrémité (+) des microtubules en croissance. Cette localisation particulière peut être due à la reconnaissance directe d'une structure spécifique à l'extrémité (+), par co-polymérisation avec la tubuline, par l'interaction avec une autre protéine qui reconnaît l'extrémité (+) ou par diffusion le long du corps du microtubule.

Adapté de Akhmanova et Steinmetz 2008.

diminution de la vitesse de dépolymérisation. Ces modifications de la dynamique aboutissent à l'augmentation de la quantité de microtubules polymérisés dans une condition où la protéine est présente. Au contraire, la déstabilisation diminue la quantité de microtubules formés, principalement en augmentant la fréquence de catastrophe, les effets sur les autres paramètres de l'instabilité dynamique n'étant pas systématiques. Les MAP qui promeuvent la dynamique des microtubules le font, en général, en augmentant tous les paramètres excepté le taux de dépolymérisation, de sorte que les microtubules changent plus souvent de phase en leur présence.

Sachant que l'instabilité dynamique est une propriété intrinsèque des microtubules, quels sont les modes d'action des facteurs protéiques qui la régulent ? La polymérisation d'un microtubule est le résultat de l'ajout de dimères de tubulines à l'extrémité de chacun des protofilaments du microtubule (~ 13 en général). Bien que la vitesse de polymérisation soit directement proportionnelle à la concentration en dimères de tubulines, le taux d'association de la tubuline est de l'ordre du $\mu\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$. Cette valeur est très proche de celles obtenues pour les taux d'interactions protéine-protéine les plus efficaces. On peut donc imaginer que la polymérisation des microtubules ne soit limitée que par la diffusion des dimères de tubulines libres. Il ne faut toutefois pas oublier qu'un microtubule est composé d'une dizaine de protofilaments et que sa vitesse de polymérisation est le résultat de l'ajout de dimères à l'extrémité de chacun de ces protofilaments. *In vitro*, en présence de 10 μM de dimères de tubulines, un microtubule croît d'environ 1 μm par minute, ce qui correspond à l'ajout d'une trentaine de dimères de tubulines par seconde, soit 2-3 dimères par protofilament par seconde. Le taux d'association par protofilament est donc environ 10 fois plus faible que celui mesuré pour le microtubule, ce qui laisse une marge de manœuvre (environ un ordre de grandeur) à la cellule pour trouver des protéines capables d'augmenter ce taux d'association avant que celui-ci ne soit limité par la diffusion (Howard et Hyman, 2007). Une protéine qui serait capable d'augmenter ce taux d'association, quel que soit le mécanisme impliqué, agirait comme une polymérase et augmenterait la vitesse de polymérisation des microtubules. La protéine XMAP215 (*Xenopus* Microtubule Assembly Protein of 215 kDa) ; identifiée en 1987 pour sa capacité à promouvoir l'assemblage des microtubules (Gard et Kirschner, 1987), a depuis lors, révélée qu'elle était une polymérase (Brouhard *et al.*, 2008). XMAP215 est associée *in vitro* à l'extrémité (+) des microtubules en croissance, ce qui en fait une +TIP, mais aussi avec le corps des microtubules et l'extrémité (+) en dépolymérisation, ce qui en fait une MAP

particulière. XMAP215 reste non seulement accrochée à l'extrémité (+) en dépolymérisation, mais semble aussi s'y accumuler au cours de la dépolymérisation. Cette accumulation proviendrait du recrutement à l'extrémité (+) des protéines situées le long du microtubules avant l'évènement de catastrophe (Brouhard *et al.*, 2008, « data not shown »). En présence de XMAP215, la vitesse de polymérisation des microtubules est augmentée, mais cette MAP ne fait pas que promouvoir la croissance des microtubules. En effet, dans des conditions où la croissance est défavorable, la protéine va augmenter la vitesse de dépolymérisation. Ces deux constats indiquent que XMAP215 se comporte comme une enzyme catalytique dans le sens où ce type d'enzyme accélère une étape d'une réaction dans un sens ou dans l'autre. Ainsi, *in vitro*, lorsque les conditions sont favorables à la polymérisation, XMAP215 va catalyser l'assemblage des microtubules, mais elle va aussi accélérer la dépolymérisation des microtubules lorsque les conditions deviennent défavorables à la polymérisation. De plus, XMAP215 découple polymérisation et fréquence de catastrophe. En effet, son action sur la vitesse de polymérisation ne réduit pas la fréquence de catastrophe (Howard et Hyman, 2007). XMAP215 est très conservée puisque des orthologues ont été identifiés chez de nombreux eucaryotes examinés (Gard *et al.*, 2004). *In vivo*, XMAP215 et ses orthologues Msps (Mini Spindles) et MOR1 (Microtubule Organisation 1) sont impliqués dans la division cellulaire chez *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster* (Cullen *et al.*, 1999) et *Arabidopsis thaliana* (Whittington *et al.*, 2001) respectivement. De plus XMAP215/Msps/MOR1 semble nécessaire à l'organisation d'un réseau interphasique de microtubules. En son absence, le réseau de microtubules est désorganisé à la fois chez *Arabidopsis thaliana* (Kawamura *et al.*, 2006) et la drosophile (Moon et Hazelrigg, 2004). L'effet de XMAP215 sur la dynamique des microtubules observé *in vitro* est conservé *in vivo* puisque les microtubules sont moins dynamiques chez des mutants de MOR1 (Kawamura et Wasteneys, 2008) et de Msps (Currie *et al.*, 2011, Trogden et Rogers, 2015). Il semble donc que XMAP215 se comporte comme une polymérase et un facteur stimulateur de dynamique *in vitro* et *in vivo*.

Comme nous l'avons présenté précédemment (I,2,b), la transition d'un microtubule d'une phase de croissance à une phase de dépolymérisation est vue comme étant le résultat de la disparition de la coiffe GTP et/ou de la coiffe conformationnelle qui permettent à l'extrémité (+) de rester en croissance. En effet, lors de l'incorporation d'un hétérodimère de tubuline, l'énergie résultant de l'hydrolyse du GTP de ce dernier serait stockée dans le corps du microtubule et serait libérée lors de la dépolymérisation. Le microtubule serait donc sous

tension mécanique et c'est l'extrémité (+) qui stabiliserait le microtubule (le feuillet courbe en extension, plus stable que le tube, imposerait sa stabilité à l'ensemble du filament). On s'attend donc à ce que des protéines capables de modifier la vitesse d'hydrolyse du GTP ou la structure de l'extrémité (+) augmentent la fréquence des événements de catastrophe. Une autre stratégie pour induire des catastrophes serait de réduire localement la concentration en tubulines pour empêcher la polymérisation. Jusqu'ici deux types de dépolymérase ont été décrits. Les premières appartiennent à une famille de kinésines, les kinésines-13, dont l'un des premiers membres identifiés pour son effet sur les catastrophes est XKCM1 (*Xenopus* Kinesin Central Motor 1). A la même époque, une autre protéine induisant des catastrophes est identifiée, il s'agit de Op18 (Oncoprotein 18) qui appartient à la famille des stathmines, une autre famille de dépolymérase. Ces deux protéines diffèrent par leurs mécanismes d'action. Ainsi XKCM1 est capable d'augmenter la fréquence de catastrophe de microtubule assemblés à partir de tubuline liée à un analogue non hydrolysable du GTP (le GMPCPP), alors que Op18 en est incapable. De plus, l'activité de XKCM1 nécessite la présence d'ATP, ce qui n'est pas le cas de Op18 (Walczak, 2000). Notons également que l'activité de Op18 ne touche que les extrémités (+), alors que XKCM1 est capable de dépolymériser également les extrémités (-). Ces résultats suggèrent que Op18 pourrait agir en induisant l'hydrolyse du GTP et donc la disparition de la coiffe GTP. Cependant, suivant les conditions expérimentales, Op18 est également capable de séquestrer les dimères de tubulines libres *in vitro*, notamment lorsque le pH du milieu utilisé est légèrement acide (~ 6,8) (Howell *et al.*, 1999). Op18 semble posséder deux domaines, l'un en C-ter de la protéine, impliqué dans la séquestration des dimères libres, l'autre en N-terminal capable d'induire les catastrophes, probablement par la stimulation de l'hydrolyse du GTP. XKCM1 ne présente pas le même mécanisme de déstabilisation que Op18. En effet, en plus d'être capable de se déplacer le long des microtubules pour atteindre l'extrémité (+), elle mettrait à profit son activité motrice pour déformer l'extrémité des protofilaments et ainsi induire des catastrophes. XKCM1 semble, en effet, induire la courbure des protofilaments de microtubules à l'extrémité (+) des microtubules, vers l'extérieur du tube, moyennant l'hydrolyse d'ATP. Cette courbure subie par les protofilaments réduirait leurs interactions latérales et pourrait ainsi déstabiliser suffisamment l'extrémité (+) pour induire un événement de catastrophe. Cela est d'ailleurs cohérent avec les événements architecturaux observés à l'extrémité des microtubules lors d'une dépolymérisation. En effet, un événement de catastrophe se traduit par une individualisation des protofilaments qui tendent ainsi à se recourber vers l'extérieur du tube

(Intro Partie 1 Figure 12). *In vivo*, XKCM1 et Op18 sont impliquées dans la division cellulaire *via* leurs rôles dans la régulation de l'instabilité dynamique des microtubules. Il est à noter toutefois que XKCM1 et Op18 semblent moins bien conservées que XMAP215 puisque aucun orthologue n'a été identifié chez les plantes. Toutefois la famille des kinésines-13 compte des représentants dans de nombreuses espèces comme MCAK (Mitotic Centromere-Associated Kinesin) chez l'humain et Kif2 (Kinesin-like protein 2) chez la souris, qui tous semblent avoir conservé leur fonction pro-catastrophe.

Si certaines protéines induisent les catastrophes en provoquant la disparition de la coiffe GTP / conformationnelle, d'autres peuvent promouvoir la polymérisation des microtubules en ayant un effet positif sur ces structures. EB1 (End binding protein 1) est une protéine d'environ 300 acides aminés (268 pour la protéine humaine), conservées dans les levures, les plantes et les animaux. EB1 est connue comme étant une des premières +TIP décrites et comme étant la pierre angulaire du réseau de protéines recrutées à l'extrémité (+) des microtubules (Tirnauer et Bierer, 2000, Schuyler et Pellman, 2001, Morrison *et al.*, 2002, Akhmanova et Steinmetz, 2008, Akhmanova et Steinmetz, 2010). EB1 a été identifiée dans un crible double hybride pour son interaction avec l'oncosuppresseur APC (Adenomatous Polyposis Coli) (Su *et al.*, 1995). Chez les animaux, il n'existe qu'un gène codant pour EB1. Ce gène est conservé chez les levures *Schizosaccharomyces pombe* (Mal3p) et *Saccharomyces cerevisiae* (Bim1p) (Beinhauer *et al.*, 1997, Schwartz *et al.*, 1997) ainsi que chez les plantes, où trois orthologues ont été identifiés (EB1 a, EB1 b et EB1 c) (Gimona *et al.*, 2002, Korenbaum et Rivero, 2002, Chan *et al.*, 2003, Mathur *et al.*, 2003,). EB1 contient dans sa partie N-terminale un Calponin Homology Domain (CH domain), responsable de son association aux microtubules. Elle possède aussi un motif EEY très conservés dans sa partie C-ter et un domaine EBH (End Binding Homology) dans sa partie centrale permettant le recrutement de partenaires. Le domaine EBH a permis de définir une famille de protéines nommée EBx (1, 2 ou 3) chez les mammifères, toutes localisées à l'extrémité (+) des microtubules. La région N-terminale des orthologues identifiés chez les plantes (EB1a, EB1b et EB1c) est nettement plus conservée que leur extrémité C-ter (Mathur *et al.*, 2003). En effet, bien que très semblables entre eux, ces trois gènes peuvent être divisés en deux groupes distincts : (1) EB1a et EB1b qui sont similaires à 67% et qui sont ceux qui ressemblent le plus aux gènes codant EB1 dans les autres règnes, avec toutefois une région C-ter riche en acide aminés acides au lieu du domaine EEY présent presque partout ailleurs ; (2) EB1c qui possède

moins de similitudes avec ces paralogues, EB1a et EB1b, et qui contient notamment deux NLS (Nuclear Localization Signal), non canoniques, dans sa partie C-ter. Ces trois protéines partagent avec leurs orthologues la capacité de s'associer aux extrémités (+) des microtubules en croissance et sont des +TIP *in vivo* (Pedersen *et al.*, 2003, Chan *et al.*, 2003, Mathur *et al.*, 2003). Cependant, les deux domaines NLS de EB1c le confine dans le noyau des cellules végétales en interphase, alors que EB1a et EB1b sont cytosoliques. Chez les animaux, le domaine EEY de EB1 lui permet de recruter des partenaires ayant un domaine CAP-Gly et son domaine EBH des partenaires ayant un domaine S(X)IP (Steinmetz et Akhmanova, 2008, Akhmanova et Steinmetz, 2010). Chez les plantes, le domaine EEY n'est pas conservé et aucune protéine ne semble posséder de domaine CAP-Gly proprement dit. En revanche, le domaine EBH est bien présent dans EB1a, b et c et devrait donc permettre l'interaction avec des partenaires ayant un domaine S(X)IP. D'ailleurs, une recherche de ce domaine parmi les protéines de *Arabidopsis thaliana* révèle l'existence de 559 interactants potentiels (David Bouchez, communication personnelle). Chez les levures, le domaine EBH est conservé, et le domaine EEY, bien que dégénéré, semble également conservé (ITF et ETF dans Mal3p et Bim1p chez *Schizosaccharomyces pombe* et *Saccharomyces cerevisiae* respectivement). Quel que soit l'espèce concernée, EB1 paraît donc capable de recruter à l'extrémité (+) des microtubules en croissance un grand nombre de partenaires *via* l'un et/ou l'autre de ces domaines. En recrutant des partenaires à l'extrémité (+) des microtubules, EB1 confère à ces microtubules différentes propriétés. Ainsi, c'est par l'intermédiaire d'EB1 que les microtubules interagissent dans les cellules de mammifères avec STIM1 (Stromal Interaction Molecule 1). Comme évoqué première partie d'introduction, STIM1 est située sur la membrane du réticulum endoplasmique et son interaction avec les microtubules, par l'intermédiaire de EB1, permet à ces derniers de déformer le réticulum de façon à former des tubules (Grigoriev *et al.*, 2008) (Chapitre I c ii). Chez les plantes, aucun orthologue de STIM1 n'a été identifié jusqu'ici, en revanche une étude suggère que EB1b serait localisée sur la membrane du réticulum endoplasmique, pouvant ainsi faire un lien dynamique entre ce compartiment et les microtubules (Mathur *et al.*, 2003). La capacité de EB1 à s'associer physiquement avec de multiples partenaires confère aux microtubules la capacité d'interagir avec de nombreuses structures. Chez les mammifères, lors de la migration cellulaire, EB1 contribue à la stabilisation transitoire des microtubules au cortex du lamellipode en permettant l'interaction des microtubules avec APC (Wen *et al.*, 2004). L'interaction de EB1 avec APC permet également de stabiliser les microtubules des fibres kinetochoriennes lors de la division

cellulaire et ainsi participer à la ségrégation des chromosomes (Fodde *et al.*, 2001, Kaplan *et al.*, 2001). Somme toute, la présence de EB1 à l'extrémité (+) des microtubules, ainsi que sa capacité d'y recruter de nombreux partenaires, combinée au mécanisme de « search and capture », promeut l'interaction des microtubules avec de nombreuses structures. Toutefois la localisation de EB1 à l'extrémité (+) des microtubules en croissance n'en fait pas seulement une plateforme de recrutement d'autres partenaires, elle est aussi au bon endroit pour réguler à la fois l'architecture et l'instabilité dynamique des microtubules. En effet, plusieurs études ont constaté l'effet de EB1 sur la dynamique des microtubules *in vitro*. Lorsqu'elle est présente, EB1 augmente les fréquences de transitions (Tirnauer *et al.*, 1999, Rogers *et al.*, 2002, Coquelle *et al.*, 2009) rendant les microtubules très dynamiques. En sus de sa localisation à l'extrémité (+) en croissance, EB1 a une affinité faible pour le corps des microtubules puisque, lorsqu'elle est surexprimée *in vivo* (Chan *et al.*, 2003), ou présente en très grande quantité *in vitro* (Maurer *et al.*, 2012), elle s'y associe. Les mécanismes qui permettent à EB1 de se localiser à l'extrémité (+) des microtubules et d'influencer leur dynamique ne sont pas clairement élucidés, toutefois il ne s'agit pas d'une copolymérisation avec les dimères de tubulines (Ligon *et al.*, 2006). De récentes études ayant cherché à localiser très précisément le site d'interaction de EB1 à l'extrémité (+) des microtubules éclairent sa capacité à augmenter la dynamique des microtubules. En effet, la zone sur laquelle EB1 s'accumule à l'extrémité (+) des microtubules coïncide avec le feuillet de protofilaments de la coiffe conformationnelle (Guesdon *et al.*, 2016). EB1 se lie aux microtubules au point de contact entre 4 hétéro-dimères de tubulines (Maurer *et al.*, 2012). C'est probablement cette localisation qui permet à EB1 d'induire la formation de microtubules à 13 protofilaments et de promouvoir la fermeture du feuillet de protofilaments en un tube (Maurer *et al.*, 2012, des Georges *et al.*, 2008, Vitre *et al.*, 2008, Zhang *et al.*, 2015, Guesdon *et al.*, 2016). L'effet positif de EB1 sur la dynamique des microtubules résulterait de sa capacité à induire la fermeture du feuillet (Vitre *et al.*, 2008.). En effet, cette action aurait pour conséquence une augmentation la vitesse de polymérisation mais également une augmentation des fréquences de catastrophes puisque, lorsque cette activité de EB1 sur la fermeture des feuillets en tube dépasserait la vitesse de croissance du feuillet, la taille de celui-ci diminuerait et par la même son action stabilisatrice, rendant le microtubule plus prompt à subir un évènement de catastrophe (Coquelle *et al.*, 2009).

Comme nous venons de le voir, les microtubules sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires. Leur implication dans ces processus variés dépend de l'organisation tridimensionnelle du réseau formé par les microtubules. Cette organisation est régulée par la cellule principalement en ajustant la dynamique des microtubules. En effet, leur extrémité (+) est très dynamique, ce qui se traduit par un comportement particulier, une succession de phases de polymérisation et de dépolymérisation pouvant faire plusieurs microns de long. Lors de phases de polymérisation, les microtubules sont à même d'interagir avec les structures cellulaires qu'ils rencontrent. Ces interactions sont possibles grâce à la présence à l'extrémité (+) des microtubules de nombreuses protéines capables de faire le lien entre les microtubules et ces structures. Ces interactions peuvent modifier le comportement de certains microtubules et ainsi permettre au réseau d'adopter différentes organisations, c'est le modèle du « search and capture ». Toutefois, il existe des cellules dans lesquels le réseau de microtubule change d'orientation sans modification de la dynamique de l'extrémité (+). Dans l'hypocotyle d'*A. thaliana* (portion de tige située entre les cotylédons et la racine) en élongation, les cellules épidermiques présentent un réseau de microtubule transverse, les microtubules sont majoritairement perpendiculaires à l'axe d'élongation de la cellule. Cette orientation devient parallèle à l'axe d'élongation (organisation longitudinale) lorsque l'élongation cesse. Ce processus de réorientation fait intervenir la katanine. Cette protéine est capable de couper un microtubule en deux *in vitro* mais elle ne semble pas directement influencer la dynamique de l'extrémité (+) des microtubules (Burk et Ye, 2002, Stoppin-Mellet *et al.*, 2002). *In vivo*, la katanine coupe les microtubules au point d'intersection entre deux microtubules. Cette action génère deux nouvelles extrémités. L'extrémité (+) ainsi générée provient du corps du microtubule coupé et est donc constituée de dimère-GDP. Elle ne présente ni coiffe GTP, ni coiffe conformationnelle. *In vitro* cette extrémité (+) dépolymérise rapidement. *In vivo*, dans le processus de réorientation qui nous intéresse, décrit par Lindeboom et al. en 2013, l'activité de la katanine génère de nouvelles extrémités (+) qui vont polymériser. Ainsi, lorsque dans le réseau transverse, un microtubule qui n'est aligné avec le réseau en croise un autre alors il va être coupé par la katanine. L'extrémité (+) créée ne dépolymérise pas mais recommence à croître, de sorte que l'évènement de croisement, combiné à l'action de la katanine, a généré un nouveau microtubule. Ce mécanisme d'amplification permet à la cellule de faire rapidement émerger un réseau longitudinal d'un nombre restreint d'évènements de croisements initiaux et ne requiert que la stimulation d'évènements de sauvetage après l'action de la katanine, au niveau de la nouvelle extrémité

(+) ainsi générée. En effet, les microtubules transverses étant dynamique, le réseau fini par disparaître au profit du réseau longitudinal (Lindeboom *et al.*, 2013). Lors de l'évènement de croisement la katanine coupe préférentiellement le microtubule le plus « jeunes » (qui est celui le plus longitudinal en général). Le mécanisme expliquant cette sélection reste à élucider. Cependant, il faut noter que les microtubules sont rarement isolés dans le réseau cortical d'*A. thaliana*. En effet, différentes protéines sont à même d'associer latéralement plusieurs microtubules entre eux pour former des faisceaux. Il y a de grande chance pour que les microtubules les plus jeunes soient des microtubules isolés alors que les plus anciens soient associés latéralement en faisceaux. L'association des microtubules en faisceaux pourrait les protéger de l'action de la katanine et être la raison du biais de sélection de la katanine. Dans la partie suivante, nous discuterons des mécanismes de formation de ces faisceaux de microtubules, de l'impact que ces faisceaux ont sur la dynamique et les propriétés mécaniques des microtubules et du rôle de ces faisceaux dans l'organisation globale des réseaux de microtubules.

III) Formation de faisceaux de microtubules : conséquences sur l'organisation des réseaux microtubulaires

1) Organiser les microtubules en faisceaux

Nous avons vu précédemment que les microtubules sont organisés en réseaux complexes et que de l'organisation de ces réseaux dépendent leurs fonctions. Toutefois, il faut noter que les microtubules sont le plus souvent associés latéralement à un ou plusieurs autres microtubules pour former des faisceaux. Ce sont ces faisceaux qui s'organisent en réseau plutôt que des microtubules isolés. Chez les plantes et les levures, le réseau de microtubule interphasique est particulièrement riche en faisceaux alors que, dans la plupart des cellules animales (à l'exception des neurones), la proportion de microtubules dans des faisceaux est moins claire, mais probablement bien moindre. Les faisceaux de microtubules sont observés depuis fort longtemps (Ledbetter et Porter, 1963) mais, comme souvent en biologie, une définition sans équivoque de cette structure est encore manquante. Dans la partie qui va suivre, nous présenterons d'abord quelques-uns des mécanismes généraux à l'origine de la formation des faisceaux de microtubules et, de là, nous tâcherons de trouver une définition du faisceau de microtubule avant de présenter le fonctionnement de quelques protéines connues pour leur rôle dans leur formation. Ensuite nous nous intéresserons aux rôles joués par ces faisceaux avant de finir par une présentation des mécanismes permettant l'organisation des faisceaux en réseau et le maintien de cette organisation dans le temps.

a) Faire et maintenir un faisceau de microtubules

i. Mécanismes généraux de formation des faisceaux de microtubules

La formation d'un faisceau de microtubules nécessite l'association latérale entre les microtubules impliqués. Cette association latérale requiert elle-même un rapprochement physique entre les microtubules. En sus de ce rapprochement, un facteur stabilisant l'interaction latérale entre les microtubules et donc le faisceau est souvent nécessaire puisque les microtubules étant des polymères chargés négativement (Ponstingl *et al.*, 1981), ils se repoussent. Toutefois, ce facteur peut être de différentes natures. Bien que *in vivo* ce soit principalement des protéines, certaines études *in vitro* ont démontré l'impact que peuvent jouer d'autres molécules, comme les sels. En effet, des microtubules formés *in vitro*, à partir de dimères de tubulines purifiés depuis des cerveaux de porc ou de veau, se regroupent

parfois en faisceaux même en l'absence d'autres protéines. La concentration en sels dans le tampon modifie la fréquence de ces regroupements. La viscosité du milieu aussi. En effet l'ajout de molécule telle que la méthyl-cellulose qui augmente la viscosité du mélange augmente la fréquence de ces regroupements. Pour autant, les sels ou la méthyl-cellulose ne semblent pas lier physiquement les microtubules les uns aux autres, contrairement aux faisceaux formés par des protéines. Ces protéines vont effectivement lier les microtubules impliqués dans le faisceau les uns aux autres, soit en ayant un seul site de liaison aux microtubules et la capacité de former des oligomères interagissant avec plusieurs microtubules, soit en ayant plusieurs sites d'interaction avec les microtubules, ce qui permet à la même protéine d'interagir avec plusieurs microtubules du faisceau. (Figure 16 A). De ce fait, l'espacement entre les microtubules d'un faisceau est fonction de la protéine qui le forme.

Les regroupements de microtubules formés en présence de sels, d'un tampon visqueux ou de protéines liant plusieurs microtubules peuvent-ils tous être considérés comme des faisceaux ? A première vue, la réponse à cette question est non. En effet, d'après sa définition première un faisceau est : « un assemblage d'objets liés ensemble ». Or, seuls les regroupements impliquant des protéines présentent une liaison entre les éléments du faisceau. Cependant, des « faisceaux » de microtubules sont observés et décrits dans la littérature sans que l'on sache à chaque fois si un lien est présent ou non. De plus, le cytosol des cellules est un environnement très visqueux ce qui augmente la probabilité de formation d'un « faisceau » même en l'absence de protéines faisant la liaison. De ce fait, et comme indiqué plus haut, la définition du faisceau de microtubule est délicate, nous considérerons, dans le reste de cette thèse, que chaque fois qu'un regroupement latéral de microtubule est observé il pourra être qualifié de faisceau même si l'existence d'un lien entre les éléments du faisceau n'est pas démontrée.

Les microtubules étant de longs polymères, souvent associés à d'autres structures, leurs déplacements latéraux sont peu fréquents de sorte que le rapprochement physique nécessaire à la formation d'un faisceau est bien souvent l'évènement de rencontre entre l'extrémité (+) d'un microtubule en polymérisation et un autre microtubule. Toutefois, dans les cellules végétales, en absence de centrosome, la nucléation de nouveaux microtubules se fait principalement le long de microtubules déjà présents. Ces évènements de nucléation peuvent

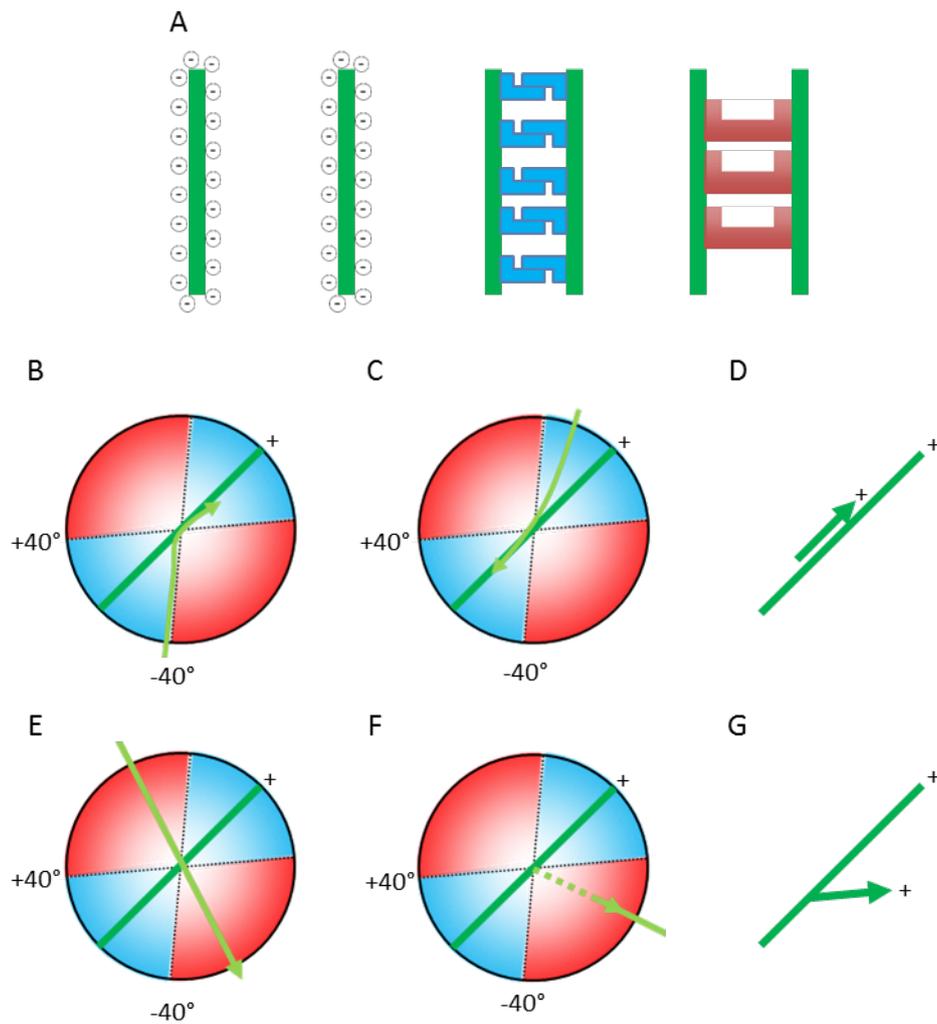


Figure 16 : Formation de faisceaux de microtubules.

Les microtubules sont des polymères chargés négativement (A). La formation de faisceaux de microtubules nécessite donc la présence de protéines capable de lier ensemble les microtubules. La liaison peut être réalisée par des dimères (ou des oligomères) de protéines ou par des protéines ayant deux sites de liaison aux microtubules (A).

La formation d'un faisceau de microtubules résulte d'un évènement de croisement à moins de 40° (zone bleue) (B et C) ou de la nucléation d'un microtubule parallèlement à autre (D).

Lorsque l'angle de croisement est supérieur à 40° (zone rouge), le microtubule incident peut continuer son chemin c'est un cross-over (E), ou subir une catastrophe, c'est un touch-and-go (F). La nucléation branchée (G) ne permet pas de former un faisceau de microtubules.

être parallèles ou obliques suivant que l'angle formé par le microtubule fraîchement polymérisé et l'ancien soit nul ou non. En moyenne, lors de nucléations obliques, l'angle ainsi formé est de 40° (Wasteneys et Williamson, 1989) alors qu'il est supposé être nul lors de nucléations parallèles. Bien évidemment, lors de nucléation parallèle il s'en suit quasi-systématiquement la formation d'un faisceau. En résumé, la formation d'un faisceau a donc lieu après le rapprochement physique de deux microtubules, rapprochement qui peut être dû au croisement de deux microtubules ou à la nucléation d'un microtubule le long d'un microtubule déjà existant (Figure 16).

Lors du croisement de deux microtubules, la géométrie de l'intersection ainsi formé conditionne la formation du faisceau. En effet, des études réalisées *in vitro* ont montré que plus l'angle d'interaction est aigu plus la chance de formation d'un faisceau est grande (Portran *et al.*, 2013). Ces résultats ont également été confirmés *in vivo* (Dixit et Cyr, 2004). De plus, les expériences *in vitro* indiquent que la géométrie mais également l'orientation des deux microtubules (l'un par rapport à l'autre) conditionnent la formation du faisceau. Effectivement, certaines protéines stabilisant le faisceau forment plutôt des faisceaux parallèles (les microtubules sont dans la même orientation) et d'autres plutôt des faisceaux anti-parallèles (Portran *et al.*, 2013).

ii. Les protéines de pontage

A l'instar des MAP et des +TIP, les fusions GFP ont permis de localiser un certain nombre de protéines sur des faisceaux de microtubules sans que leur implication directe dans la formation de ces derniers ne soit clairement démontrée. De ce fait, le nombre de protéines connues pour participer à l'assemblage des microtubules en faisceaux est réduit et repose le plus souvent sur des données obtenues *in vitro*.

TAU

TAU est une protéine identifiée en 1975 par l'équipe de Marc Kirschner (Weingarten *et al.*, 1975) car elle co-purifiait avec la tubuline de cerveau de porc et stabilisait les microtubules. TAU est constituée d'un domaine C-ter responsable de l'interaction avec le microtubule et d'une partie N-ter qui se projette loin du microtubule (Mohan et John, 2015). La partie C-ter, en plus de permettre l'interaction avec les microtubules, contient une région

composée de séquences répétées qui promeut l'assemblage des microtubules. Il y a six isoformes majeures de TAU dans le cerveau des mammifères. Elles sont le résultats d'un épissage alternatif et diffèrent principalement de par le nombre de répétitions contenues dans la partie C-ter (Mohan et John, 2015). TAU est impliquée dans la formation des axones des neurones (Caceres et Kosik, 1990). Son rôle dans ce mécanisme a été très étudié car des formes mutées de la protéine provoquent des tauopathies (dégénérescences du cerveau). Il est apparu très tôt que son rôle dans la formation des axones provient de sa capacité à induire la formation de faisceaux de microtubules *in vivo* (Knops *et al.*, 1991) et *in vitro* (Scott *et al.*, 1992). La formation de faisceaux provient de la capacité de la protéine à former des dimères *via* des interactions permises par sa partie N-ter. Ce mécanisme peut être régulé par phosphorylation. En effet il semble que le niveau de phosphorylation de TAU influence à la fois sa capacité à former des faisceaux (Lovestone *et al.*, 1996) et la stabilité des faisceaux formés (Sang *et al.*, 2001).

MAP65-1

MAP65-1 est une protéine de 65kD identifiée chez les plantes pour sa capacité à se lier aux microtubules (Chang-Jie et Sonobe, 1993) et faisant partie d'une famille de protéines (Smertenko *et al.*, 2000) comptant 9 membres chez *Arabidopsis thaliana* et 3 membres chez *Nicotiana tabacum* (Hussey *et al.*, 2002). Cette famille de protéines est conservée chez les mammifères (Protein Regulator of Cytokinesis 1 (PRC1)) et chez les levures (Anaphase spindle elongation 1 (ASE1)). Dans des cellules de tabac en culture (BY2), exprimant la tubuline- α -6 liée à la GFP, MAP65-1 est associée aux microtubules les plus fluorescents, qui semblent donc être des faisceaux (Van Damme *et al.*, 2004) (Figure 17). Cette idée est confirmée par les résultats obtenus *in vitro* et montrant que MAP65-1 forme des faisceaux (Smertenko *et al.*, 2004). *In cellulo* et *in vivo*, les faisceaux positifs pour MAP65-1 sont résistants à la dépolymérisation induite par certaines drogues comme la propyzamide ou l'amiprofos-méthyl (Van Damme *et al.*, 2004), par les sels (Zhang *et al.*, 2012) ou par le froid (Meng *et al.*, 2010). PRC1 et ASE1 sont également capables de former des faisceaux de microtubules en pontant deux microtubules adjacents avec un espacement de 25 à 30 nm (Chan *et al.*, 1999, Mollinari *et al.*, 2002, Schuyler *et al.*, 2003). MAP65-1 ainsi que les autres membres de la famille, possèdent un domaine de liaison aux microtubules en C-ter et un domaine « coil-coiled » en N-ter impliqué dans la dimérisation. En effet, *in vitro*, MAP65-1 s'associe avec les microtubules sous forme de monomère ; si les microtubules sont

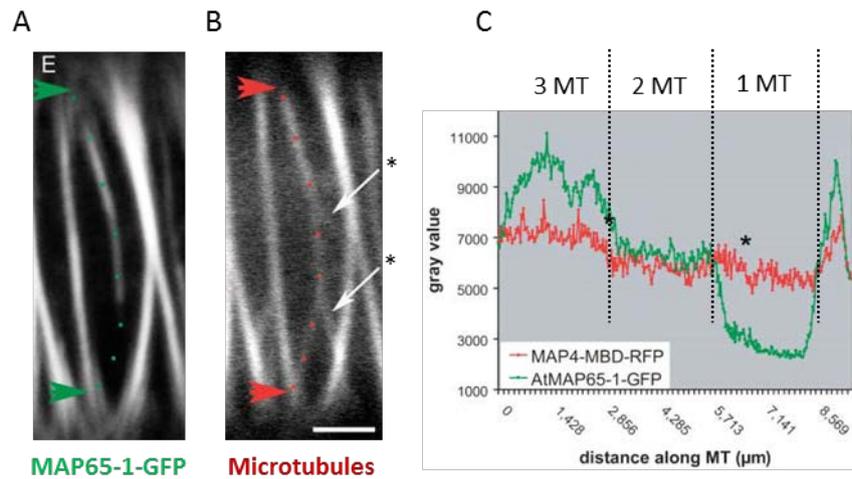


Figure 17 : MAP65-1 est préférentiellement associée aux faisceaux de microtubules *in vivo*.

Réseau de microtubules dans une cellule de tabac en culture (BY-2) exprimant les fusions traductionnelles AtMAP65-1-GFP (A) et RFP-MBD (B).

La fluorescence le long du faisceau de microtubule compris entre les flèches en (A) et (B) est indiquée en (C). Les astérisques indiquent les endroits où les microtubules individuels quittent le faisceau. La variation de la fluorescence verte indique que MAP65-1 est associée au faisceau mais pas ou peu au microtubule isolé. Barre d'échelle, 2,5 μm.

D'après Van Damme *et al.*, 2004.

suffisamment proches, deux monomères associés à deux microtubules différents vont former un dimère et donc un faisceau (Portran *et al.*, 2013). Toutefois, *in vivo*, la protéine ne semble être associée qu'à une sous population de faisceaux de microtubules.

Comme mentionné précédemment, l'orientation des microtubules dans les faisceaux est importante pour la formation du faisceau. Ainsi, des études *in vitro* ont montrées que MAP65-1 forme préférentiellement des faisceaux de microtubules antiparallèles (les deux extrémités (+) pointes dans des directions différentes) mais qu'elle s'associe également avec les faisceaux parallèles. La distance de 25 nm entre les microtubules qui composent le faisceau est proportionnelle à la région centrale de la protéine qui fait le lien entre le site d'interaction avec les microtubules et le site de dimérisation (Portran *et al.*, 2013). En conditionnant la distance entre les deux microtubules qui forme le faisceau, et donc la distance nécessaire à la formation du faisceau, la longueur de cette région influence également la valeur de l'angle à laquelle le faisceau peut se former au moment du croisement entre deux microtubules. En effet, plus cette région est longue plus les angles permettant la formation du faisceau sont variés (Portran *et al.*, 2013). *In vitro*, en présence de MAP65-1, il a été observé que la flexibilité des microtubules et des faisceaux était accrue. La longueur de persistance d'un microtubule est divisée par 4 en présence de MAP65-1, alors que MAP65-4 ne la modifie pas. De plus, MAP65-1 réduit la longueur de persistance des faisceaux composés de 2 et 3 microtubules d'un facteur 3 comparé à MAP65-4 (Portran *et al.*, 2013). Les microtubules étant plus souples lorsque MAP65-1 y est associés, lors d'un croisement, la formation d'un faisceau peut se faire à des angles beaucoup plus grands. Ainsi, en présence de MAP65-4, les faisceaux se forment à des angles de croisements inférieurs à 30° alors qu'en présence de MAP65-1 ils peuvent se former lors de croisements à 40 et 50 degrés (Portran *et al.*, 2013).

Chez *Arabidopsis*, MAP65-1 est ubiquitaire. Toutefois, la capacité de la protéine MAP65-1 à se lier aux microtubules est régulée pendant le cycle cellulaire. En effet, elle n'est pas associée aux microtubules pendant la division cellulaire (notamment en métaphase et en prophase). Une kinase, la Mitogen-Activated Protein Kinase 4 (MPK4) phosphoryle MAP65-1 dans sa partie C-ter, réduisant son affinité pour les microtubules (Kosetsu *et al.*, 2010). Toujours chez *Arabidopsis*, la réduction de la quantité de MAP65-1 par l'insertion d'un ADNt ou l'utilisation d'un microARN n'entraîne pas de phénotype particulier (pas de réduction de la taille des cellules/organes, pas de torsion ni de déviation des axes de croissances) (Lucas *et*

al., 2011). En revanche, une mutation de perte de fonction partielle de MAP65-2, un autre membre de la famille, réduit la taille des cellules de l'hypocotyle, ce phénotype étant amplifié par la mutation conjointe de MAP65-1. MAP65-1 et MAP65-2, semble donc partiellement redondant chez *Arabidopsis* dans le contrôle de l'élongation cellulaire des cellules de l'hypocotyle (Lucas *et al.*, 2011). Les auteurs indiquent que cette fonction ne provient pas du rôle de MAP65-1 et 2 dans l'organisation du réseau cortical de microtubules puisque ce réseau n'est pas qualitativement désorganisé en absence de ces deux protéines. Toutefois, les images fournies dans la publication soutiennent difficilement cette conclusion (*cf.* Lucas *et al.* 2011, *The Plant Cell*, Figure 8 C et D). La résistance des faisceaux formés par MAP65-1 à une dépolymérisation induite par une augmentation de la concentration en sel, observée *in vitro* et *in vivo*, semble être régulée *in vivo* par la phospholipase D. En effet, suite à un stress salin, la phospholipase D génère de l'acide phosphatidique (PA) à partir de la phosphatidylcholine (PC) de la membrane. Le PA ainsi produit est capable de se lier à MAP65-1 et promeut son activité de formation de faisceaux résistants aux sels. Ainsi, lorsque le PA n'est plus produit, à cause d'une mutation de la phospholipase D ou bien lorsque l'interaction entre le PA et MAP65-1 est empêchée par la mutation du site de liaison entre MAP65-1 et le PA, le réseau cortical de microtubules est hypersensible au stress salin et disparaît après une exposition à 50 mM de NaCl (Zhang *et al.*, 2012).

Chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, ASE1 est localisée au centre de la cellule, au niveau des zones des faisceaux de microtubules qui traversent la cellule d'une extrémité à l'autre. ASE1 permet le recrutement de Cls1p/CLASP, une +TIP bien connue pour son effet positif sur la stabilité des microtubules et la fréquence de sauvetage. De cette façon, ASE1 participe à la stabilisation des faisceaux de microtubules (Bratman et Chang, 2007). Alors que chez la levure et les plantes ASE1 et MAP65-1 semblent jouer leurs rôles en interphase, ce n'est pas le cas chez les mammifères. En effet, dans les cellules de mammifères, PRC1 est séquestrée dans le noyau pendant l'interphase. La protéine est en revanche nécessaire au maintien de la zone de chevauchement entre microtubules au milieu du fuseau mitotique pendant la division que ce soit chez les plantes, les mammifères ou les levures.

Le rôle de MAP65-1 et de ces orthologues dans le maintien et la formation des faisceaux de microtubules en fait une protéine essentielle puisque, comme nous l'avons déjà

évoqué, les microtubules sont très rarement isolés que ce soit en interphase ou pendant la division cellulaire.

b) Conséquences de la formation des faisceaux

L'association des microtubules en faisceaux, surtout lorsque ces faisceaux sont dus à la présence de protéines de pontage, modifie les propriétés des microtubules concernés. En effet chaque microtubule n'est plus complètement indépendant mais lié à au moins un autre microtubule ce qui peut modifier ses propriétés mécaniques et/ou son instabilité dynamique. Ce sont les deux points qui seront développés dans cette sous-partie.

i. Faisceaux et propriétés mécaniques

Comme nous l'avons brièvement présenté en partie I, les microtubules sont les polymères les plus rigides du cytosquelette. Cette particularité leur permet de modifier la forme des membranes cellulaires en tirant ou poussant dessus et de participer à l'établissement des propriétés mécaniques de la cellule. En réunissant en faisceaux plusieurs microtubules, on peut s'attendre à ce que les faisceaux soient plus rigides que les microtubules isolés et donc qu'ils soient particulièrement impliqués dans les fonctions du réseau fondées sur ses propriétés mécaniques. Portand et al., lors de leurs travaux sur la capacité de MAP65-1 à former des faisceaux, ont démontré que la longueur de persistance d'un faisceau de microtubules peut être de 2 à 80 fois supérieure à celle d'un microtubule isolé, déjà très rigide comparée au reste de la cellule. De plus, il est apparu que le gain de rigidité dépendait du nombre de microtubules dans le faisceau, de la géométrie du faisceau formé et de la direction de la contrainte (Figure 18). La formation de faisceaux pourrait donc rendre le réseau de microtubules encore plus rigide et ainsi participer à la régulation des propriétés mécaniques des cellules et des tissus.

Chez les plantes, certaines cellules, telles que les cellules de garde, sont soumises à des contraintes mécaniques importantes. En effet, ces cellules forment les stomates, des pores permettant les échanges gazeux entre l'intérieur et l'extérieur de l'épiderme. La forme de ces cellules change au cours de la journée de façon à ouvrir ou fermer le pore et ainsi contrôler ces échanges de gaz. Ces changements, provoqués par des modifications de la pression osmotique à l'intérieur des cellules de gardes, font subir à ces cellules des déformations

	Géométrie du faisceau	Rigidité
Microtubule isolé		1
Faisceau de 2 microtubules		2
		≈42-51
Faisceau de 3 microtubules		3
		≈84-101
		≈43-52

Figure 18 : Rigidité des faisceaux de microtubules.

La rigidité flexionnelle des faisceaux de microtubules. Les faisceaux de microtubules suivant leur géométrie sont de 2 à 100 fois plus rigides que ne l'est un microtubule isolé.

D'après Portland *et al.*, 2013.

(DeMichele et Sharpe, 1973, Franks et Farquhar, 2007). Eisinger et ses collaborateurs ont rapporté la formation de faisceaux de microtubules dans les cellules de garde de *A. thaliana* et de *Vicia faba* lors de la fermeture du stomate (Eisinger *et al.*, 2012b, Eisinger *et al.*, 2012a). Ainsi, les faisceaux étant plus résistant que les microtubules isolés, ils pourraient offrir à la cellule un moyen de résister aux déformations subies (Figure 19).

Cependant, la grande rigidité des microtubules influence également leur capacité à former des faisceaux. En effet, comme nous l'avons indiqué précédemment, lors d'un croisement, l'un des microtubules doit s'aligner sur l'autre pour former un faisceau. Pour avoir lieu, cet alignement requiert la courbure d'au moins l'un des microtubules, or ceux-ci sont très rigides. Ceci explique que les petits angles de croisements favorisent la formation de faisceaux puisqu'ils minimisent la flexion nécessaire à l'alignement (et donc l'énergie nécessaire à la déformation). C'est ici qu'interviennent les protéines de pontage (voir III, 1)). En effet, ces protéines vont forcer l'alignement en liant les microtubules l'un à l'autre. De plus, certaines protéines comme MAP65-1 facilite la formation des faisceaux de microtubules en modifiant leurs propriétés mécaniques. MAP65-1 semble réduire la rigidité des microtubules (augmenter leur capacité de flexion), ce qui facilite l'alignement et donc la formation du faisceau. La grande rigidité des microtubules semble donc limiter la formation des faisceaux. De ce fait, la formation de faisceaux est un mécanisme que la cellule peut contrôler puisqu'il nécessite l'intervention de facteur stabilisateur tel que TAU ou MAP65-1.

ii. Faisceaux et instabilité dynamique

Comme nous l'avons vu lors des chapitres précédents, la régulation de l'instabilité dynamique des microtubules contribue au contrôle de l'organisation du réseau et des fonctions qui lui sont associées. Dans ce chapitre nous découvrons un nouveau niveau de régulation de la dynamique, l'appariement en faisceau de microtubules. En effet, les microtubules sont rarement isolés dans le cytosol mais souvent associés latéralement en faisceaux. Comprendre si les microtubules contenus dans un faisceau ont la même dynamique que ceux qui sont isolés permettrait d'estimer la contribution des faisceaux à la dynamique globale du réseau.

Bien que constitués de plusieurs microtubules (de 2 à 10 en général), les faisceaux sont des filaments très fins. Compte tenu du diamètre d'un microtubule (25 nm), de la distance

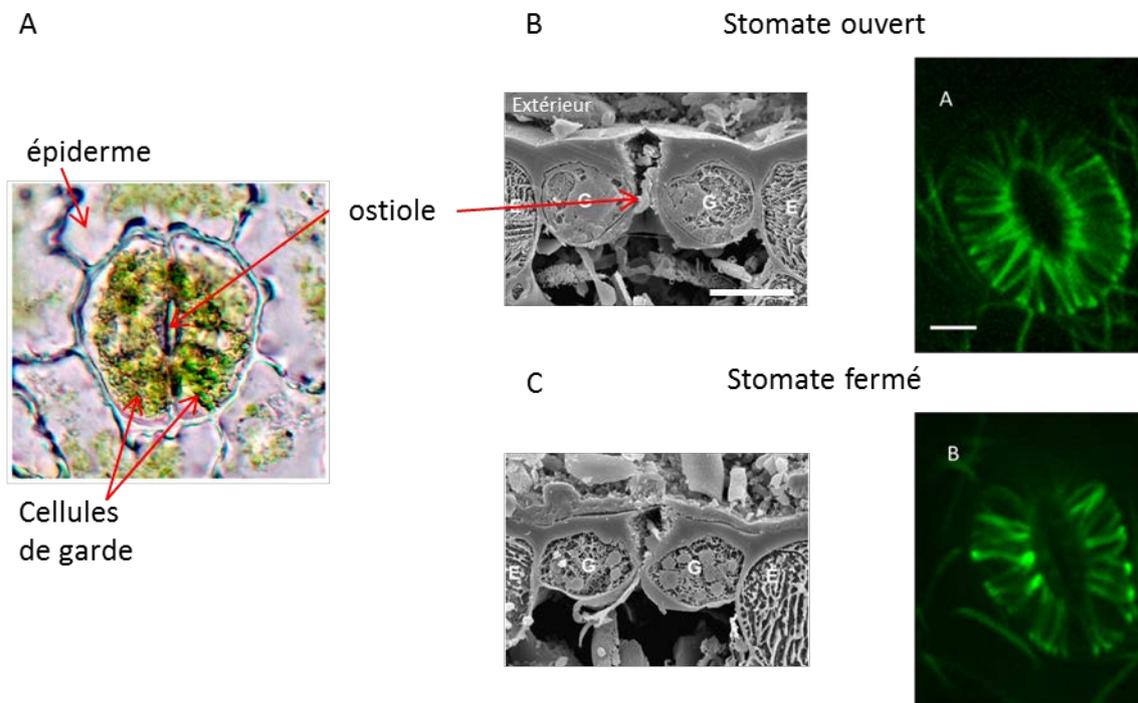


Figure 19 : La fermeture des stomates est corrélée avec la formation de faisceaux de microtubules dans les cellules de garde.

(A) Anatomie d'un stomate. Les stomates font partie de l'épiderme des feuilles. Ils sont composés de deux cellules de garde encadrant une ouverture, l'ostiole, permettant l'échange de gaz entre l'intérieur et l'extérieur de la feuille.

(B) Forme des cellules de garde dans des stomates de *H.prolifera* ou d'*A. thaliana* ouverts observés en microscopie électronique à balayage (vignette de gauche) ou en microscopie confocale (vignette de droite).

(C) Forme des cellules de garde dans des stomates de *H.prolifera* ou d'*A. thaliana* fermés observés en microscopie électronique à balayage (vignette de gauche) ou en microscopie confocale (vignette de droite).

Les microtubules sont observés, en microscopie confocale, *via* l'expression de la protéine MAP-4-GFP.

Barres d'échelle, 20 μm (cliché de microscopie électronique), 10 μm (microscopie confocale).

La forme des cellules de garde change lorsque le stomate est ouvert (B) ou fermé (C). Ce changement de forme est corrélé à l'apparition de faisceaux de microtubules dans le cortex des cellules de garde.

Adapté de Franks et Farquhar, 2007 et Eisinger *et al.*, 2012 a.

séparant les microtubules d'un faisceau (de 10 à 25 nm) et de l'organisation des microtubules dans le faisceau, celui-ci ne doit pas faire plus de 200 nm de diamètre, même lorsqu'il contient une dizaine de microtubules. Sachant que la plupart des faisceaux en contiennent moins que cela *in vivo* et que la résolution des microscopes photoniques permettant d'observer un échantillon dynamique ne dépasse pas 250 nm, il est très difficile de suivre la dynamique des extrémités (+) des microtubules à l'intérieur d'un faisceau. De ce fait, le nombre d'études ayant comparé la dynamique des microtubules isolés et des microtubules dans les faisceaux est très réduit. Dans les paragraphes suivants nous résumerons les résultats obtenus dans les quelques études qui s'y sont risquées.

Le réseau cortical de microtubules dans les cellules épidermiques de l'hypocotyle d'*Arabidopsis thaliana* est principalement composé de faisceaux de microtubules. Dans leur étude publiée en 2011, Shaw et Lucas se sont servis de ce réseau pour comparer la dynamique des microtubules incorporés ou non dans des faisceaux. Leurs observations, réalisées sur la face externe de cellules épidermiques d'hypocotyle, de plantes ayant poussé à la lumière, ne révèlent pas de différence majeure concernant la dynamique de ces deux types de microtubules. La vitesse de dépolymérisation est plus élevée à l'intérieur des faisceaux et la fréquence de sauvetage y est plus réduite. Les microtubules à l'intérieur des faisceaux pourraient donc être légèrement moins stables que ceux qui sont isolés. Toutefois, ces différences étant faibles, bien que significatives, les faisceaux ne semblent pas avoir une dynamique très différentes des microtubules isolés (Shaw et Lucas, 2011).

Dans le réseau de microtubules corticaux étudié, les seules protéines identifiées comme étant impliquées dans la formation des faisceaux (au moins *in vitro*) appartiennent à la famille MAP65/ASE1/PRC1. En 2013, Stoppin-Mellet et collaborateurs ont publié leurs travaux sur la dynamique des microtubules dans des faisceaux formés *in vitro* par MAP65-1 ou MAP65-4. Leurs observations indiquent que la seule différence, concernant l'instabilité dynamique, entre les microtubules à l'intérieur de ces faisceaux et les autres est une légère augmentation de la fréquence de sauvetage dans les faisceaux. Ce résultat obtenu *in vitro* est contraire à celui obtenu par Shaw et Lucas *in vivo*. En revanche, les auteurs ont observé une synchronisation des extrémités (+) en croissance à l'intérieur du faisceau. En effet, la durée des dépolymérisations semble diminuer au cours du temps. D'après les auteurs, plus le faisceau croît, plus les dépolymérisations sont courtes. Pour expliquer ce phénomène, les

auteurs proposent un modèle selon lequel la présence de MAP65-1 dans un faisceau freinerait la dépolymérisation. Lorsqu'une extrémité (+) en dépolymérisation atteint une molécule de MAP65-1 liant ce microtubule à un autre microtubule du faisceau soit la dépolymérisation continue et la liaison avec MAP65-1 est défaite soit la dépolymérisation s'interrompt. De ce fait, les extrémités (+) se « synchronisent » puisqu'elles passent moins de temps en catastrophe. Ce modèle semble pertinent car (1) MAP65-1 a la capacité de se lier aux faisceaux quel que soit leur polarité, bien que la protéine ait une affinité plus grande pour les faisceaux antiparallèles et (2) la dissociation de la protéine est plus facile si elle se trouve dans un faisceau parallèle (Stoppin-Mellet *et al.*, 2013).

Les avancées réalisées dans le domaine de l'analyse d'image et de la reconstruction du signal, combinées à celle réalisées dans le domaine de l'optique, ont permis, ces dernières années, l'émergence d'un certain nombre de techniques de microscopie photonique dotée d'une résolution nettement meilleure que celle de la microscopie confocale classique. Suivant la technique utilisée pour augmenter la résolution, le gain peut varier d'un facteur de 2 à 10. En 2014, une étude utilisant la microscopie SIM (Structured Illumination Microscopy) a révélé qu'il était possible de voir plus distinctement les microtubules dans le réseau cortical d'*Arabidopsis* mais aussi de suivre la dynamique des microtubules à l'intérieur des faisceaux (Figure 20). En effet, dans cette étude, Komis *et al.* bénéficient, grâce à la microscopie SIM, d'images de meilleures qualités (peu de bruit, fort contraste) avec une meilleure résolution latérales (Komis *et al.*, 2014). Les auteurs ont comparé la dynamique des microtubules observés *via* l'utilisation de deux fusions traductionnelles différentes, classiquement utilisée chez *Arabidopsis*. La première (GFP-MBD) est une chimère entre la GFP et le domaine de liaison aux microtubules de la protéine MAP4 alors que la seconde (GFP-TuA6) est une chimère de la GFP et de la tubuline- α -6. Ces deux protéines chimériques ne s'associent pas aux microtubules de la même façon. En effet, la première se lie à la paroi du microtubule alors que la seconde est incorporée à l'intérieur du microtubule comme n'importe quelle tubuline. Les observations réalisées sur la face externes de cellules épidermiques d'hypocotyles étiolés (croissance à l'obscurité) révèle (1) que les paramètres de l'instabilité dynamique mesurés avec l'une ou l'autre des constructions sont comparables et (2) qu'il n'y a pas de différences importantes de dynamique entre les microtubules isolés et ceux contenus dans les faisceaux. Les vitesses de l'extrémité (+) des microtubules lors des phases de polymérisation et de dépolymérisation ainsi que les fréquences de transitions sont légèrement augmentées dans les

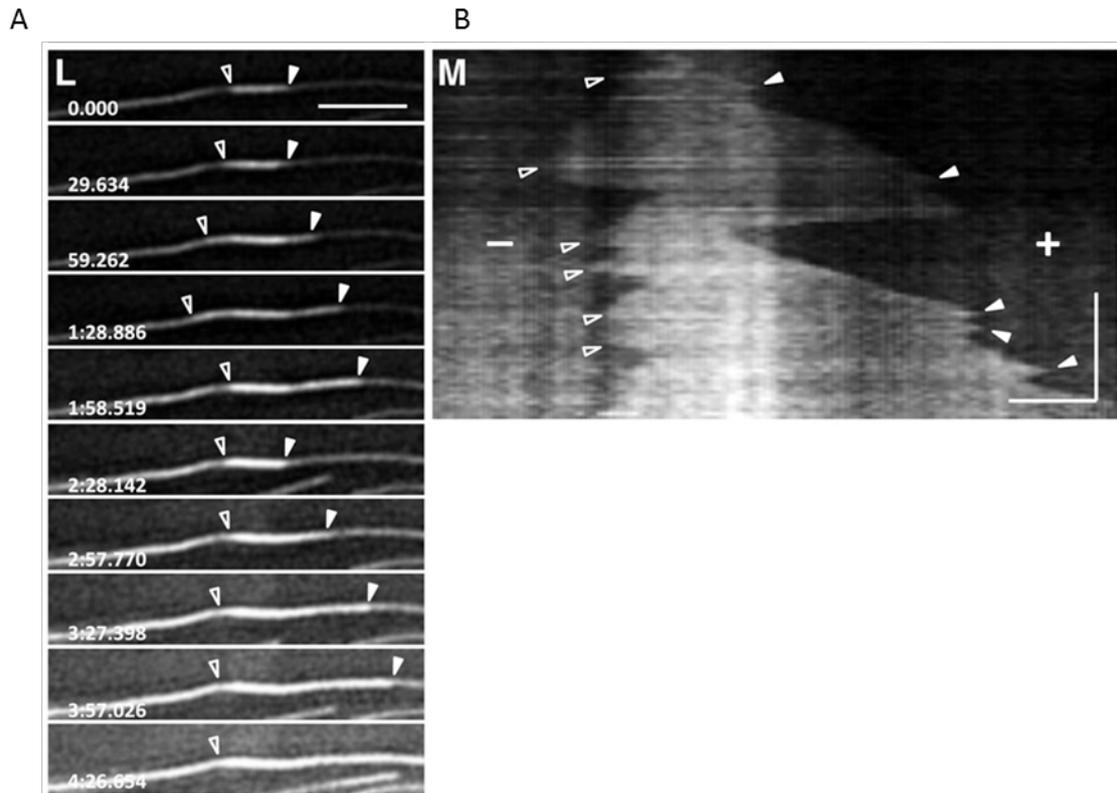


Figure 20 : Dynamique des microtubules dans un faisceau visualisé en SIM.

(A) Le SIM permet de suivre la croissance d'un microtubule à l'intérieur d'un faisceau de microtubules du cortex de *A.thaliana* exprimant la construsction GFP-MBD. Le temps est indiqué en m:s:ms. Barre d'échelle 5 μ m.

(B) Kymographe du microtubule observé en (A). Barre d'échelle 2 μ m.

D'après Komis *et al.*, 2014.

faisceaux. Bien que ces observations ne soient, dans le détail, pas totalement cohérentes avec celles faites par Shaw et Lucas, la conclusion principale demeure la même : *in vivo* la dynamique des microtubules dans les faisceaux ne semble pas drastiquement différente de celle des microtubules isolés.

In vitro il semble que les faisceaux générés par MAP65-1 ou MAP65-4 aient une dynamique différente des microtubules isolés, alors qu'*in vivo* la dynamique des microtubules contenus dans les faisceaux ne semble pas très différente de celles des microtubules isolés. Il faut savoir qu'*in vivo*, MAP65-1 ne semble pas associée à tous les faisceaux et il est probable qu'il en soit de même pour les autres MAP65 de sorte que l'effet de ces protéines sur la dynamique des microtubules observé *in vitro* puisse passer inaperçue *in vivo* car dilué dans l'ensemble des faisceaux analysés. Il est également possible que l'effet des MAP65 observé *in vitro* (Portran *et al.*, 2013) soit contrebalancé, *in vivo*, par la présence d'autres protéines associées aux mêmes faisceaux. Il paraît donc raisonnable de penser que l'incorporation d'un microtubule dans un faisceau ne change pas drastiquement sa dynamique *in vivo* dans l'hypocotyle d'*Arabidopsis*. Toutefois, dans les autres organes d'*Arabidopsis* ou dans d'autres organismes, le constat pourrait ne pas être le même. Nous allons voir dans la partie suivante que les faisceaux, même s'ils ont la même dynamique que le reste du réseau, semblent être des éléments indispensables à l'organisation globale du réseau.

2) Faisceaux et organisation du réseau

Les faisceaux semblent être les éléments fondateurs du réseau de microtubules, aux moins dans les cellules végétales et chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ainsi, chez la levure, le réseau de microtubules n'est constitué que de quelques faisceaux. Ces faisceaux organisent le réseau. Lorsque les protéines participant à la mise en place et au maintien de ces faisceaux sont absentes, le réseau de microtubule perd son organisation et les fonctions cellulaires qui en dépendent, telle que la croissance polarisée, sont affectées (Bratman et Chang, 2007).

Dans le cortex d'une cellule végétale en élongation, le réseau est transverse, les microtubules sont principalement perpendiculaires à l'axe d'élongation. La participation des faisceaux à l'organisation globale du réseau est moins claire que chez les levures, bien que le réseau soit très riche en faisceaux. Les microtubules corticaux sont ancrés à la membrane

plasmique, de ce fait ils n'explorent pas l'ensemble du volume cellulaire mais seulement un plan accolé à la membrane plasmique. Lorsqu'il polymérise, un microtubule explore une certaine portion de ce plan « à la recherche » d'une interaction qui va influencer son devenir (voir modèle du « Search and Capture » en partie I). Dans un tel réseau, compte tenu du confinement des microtubules à la périphérie, un microtubule va très souvent rencontrer un autre microtubule. Cette rencontre peut se conclure de différentes manières ; (1) le microtubule incident croise son homologue sans que rien ne se passe ; (2) la rencontre induit une catastrophe du microtubule incident ; (3) le microtubule incident va s'aligner avec son homologue pour former un faisceau. L'incorporation de ce microtubule au sein d'un faisceau réduit la portion d'espace qu'il va pouvoir explorer en polymérisant puisqu'il s'aligne sur le faisceau. Pour cette raison, la formation de faisceaux participe de fait à l'organisation du réseau. Cet effet est d'ailleurs appuyé par les résultats obtenus par Dixit et Cyr dans leur étude de 2004 (Dixit et Cyr, 2004). Dans cette étude, les auteurs mesurent les paramètres de l'instabilité dynamique et les probabilités de formation d'un faisceau lors d'évènements de rencontre dans des cellules de tabac en culture (BY-2). Les auteurs ont ensuite simulé *in silico* le devenir d'un réseau isotrope de 20 microtubules dont les paramètres d'instabilité dynamique correspondent à ceux mesurés *in vivo*. Les auteurs ont constaté que de ce réseau de 20 microtubules n'émerge un réseau anisotrope (et donc organisé) que lorsque les contacts latéraux induisent catastrophes et formation de faisceaux (Figure 21 A, B et C). Ces résultats ont été par la suite confirmés par d'autres simulations, plus complexes, prenant en compte la géométrie de la cellule. Ces travaux indiquent que le réseau de microtubules cortical s'organise grâce à deux mécanismes : la formation de faisceaux suite aux évènements de croisements à des angles inférieurs à 40° ; l'apparition de catastrophes aux sites de croisements lorsque l'angle est supérieur à 40° . (Eren *et al.*, 2010; Eren *et al.*, 2012) (Figure 21 D et E).

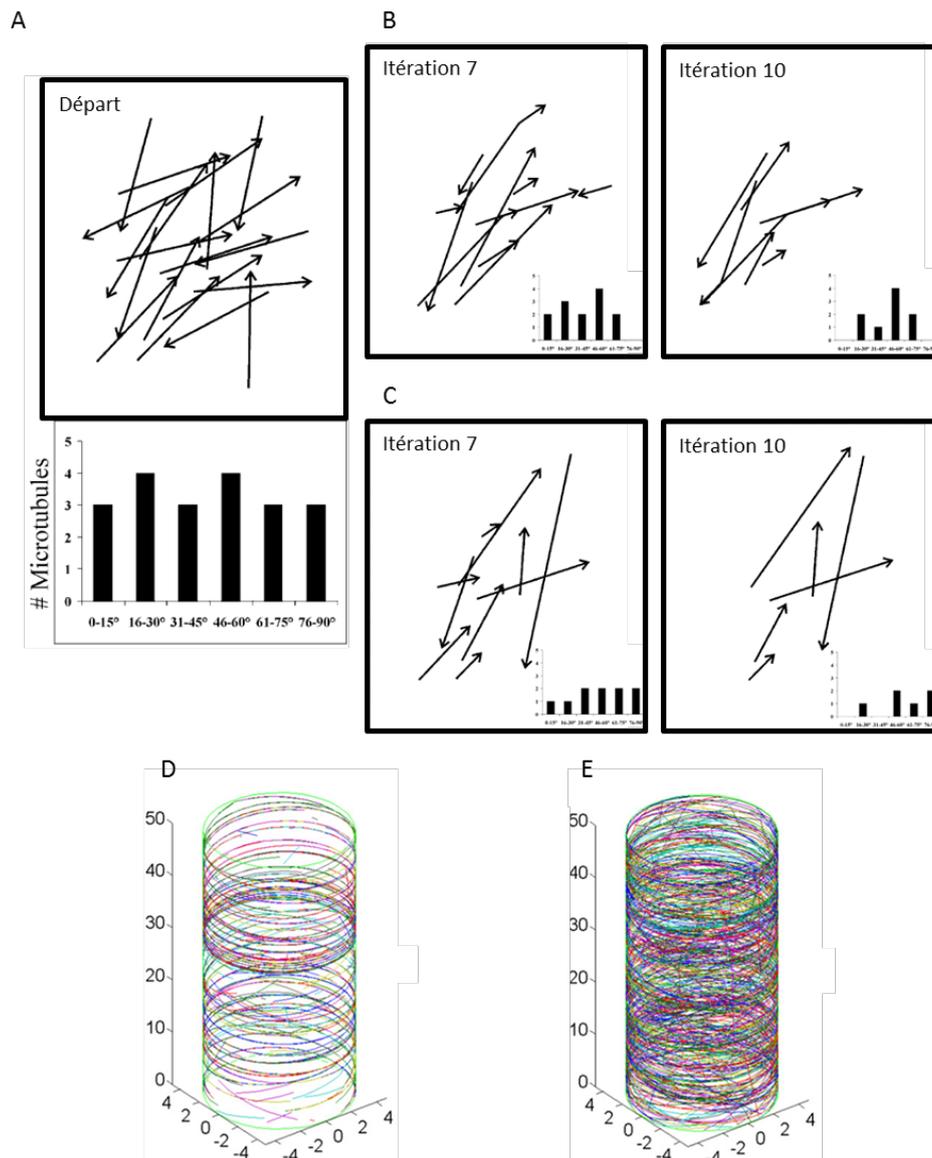


Figure 21 : La formation de faisceaux participe à l'organisation du réseau.

(A) Réseau de 20 microtubules orientés aléatoirement. Les histogrammes représentent la distribution des directions des microtubules à chaque étape de la simulation.

(B) Organisation du réseau en (A) après 7 et 10 itérations d'une simulation de Monte Carlo lorsque les événements de croisements donnent lieu à des catastrophes ou à la formation de faisceaux. Après 10 itérations, l'histogramme indique qu'une direction privilégiée a émergé.

(C) Organisation du réseau en (A) après 7 et 10 itérations d'une simulation de Monte Carlo lorsque les événements de croisements n'influencent pas les microtubules. Après 10 itérations, aucune direction privilégiée n'est visible sur l'histogramme.

(D) Simulation de l'organisation d'un réseau de microtubules en 3D lorsque les événements de croisements donnent lieu à des catastrophes ou à la formation de faisceaux.

(E) Simulation de l'organisation d'un réseau de microtubules en 3D ayant les mêmes paramètres que (D) à l'exception que les événements de croisements n'influencent pas les microtubules (ni catastrophes, ni formation de faisceaux).

D'après Dixit et Cyr, 2004 et Eren *et al.*, 2010.

IV) Le modèle d'étude, contexte et objectifs de la thèse

1) Le modèle *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana ou arabette des dames est une plante annuelle dont le cycle de vie dure quelques mois. La graine d'*Arabidopsis* contient deux cotylédons, qui sont des feuilles modifiées servant d'organes de réserves fournissant à la graine tout ce dont elle a besoin, l'eau exceptée, pour la germination et la croissance de la plantule pendant les premiers jours. Lors de la germination de la plantule le premier organe à se développer est la radicule, qui deviendra la future racine. Après le développement de la radicule, qui va chercher l'eau et les éléments nutritifs dans le milieu, la gemmule et la tigelle se déploient. Ces deux organes deviendront la future partie aérienne de la plante. La gemmule est la future partie aérienne, le développement de la tigelle est lui plus limité, elle se développera seulement pour sortir les cotylédons de terre en formant la partie de la tige appelée hypocotyle. La croissance des parties aérienne et racinaire de la plante est dite apicale. En effet, chez *Arabidopsis*, comme dans toutes les plantes, la croissance en longueur repose sur l'activité de deux massifs de cellules placés l'un à l'apex de la racine l'autre à l'apex de la tige. Ces deux organes sont les méristèmes apicaux racinaires et caulinaire. Ils sont constitués de petites cellules, indifférenciées, dont la plupart sont constamment en division. Ces cellules ont un réseau de microtubules cortical orienté dans les deux directions (latéralement et longitudinalement). Cette activité mitotique fournit les cellules qui forment la tige et la racine. Avant de se différencier dans les différents types cellulaires qui forment tige et racine, ces cellules vont subir une étape d'élongation. Il y a donc un gradient de différenciation le long de la tige et de la racine, gradient qui reflète « l'âge » des cellules. Les cellules en élongation, situées juste en retrait du méristème, sont caractérisées par leur croissance en longueur très rapide. Cette croissance est soutenue notamment par un réseau de microtubules cortical transverse, dont l'orientation est perpendiculaire à l'axe de croissance. De façon concomitante avec l'arrêt de la croissance, le réseau de microtubule change d'orientation et devient longitudinal, parallèle à l'axe de croissance dans les cellules qui entre en différenciation. Ce comportement est encore plus clair dans l'hypocotyle. En effet dans cette partie de la tige, située sous les cotylédons, il n'y a pas de division cellulaire. L'épiderme de l'hypocotyle compte une vingtaine de cellules en tout. Lorsque les graines germent à l'obscurité, le réflexe physiologique de la plante est de chercher à sortir de la zone ombragée dans laquelle elle se trouve. Pour cela l'hypocotyle s'allonge de façon extrême jusqu'à mesurer, après 9 jours

d'obscurité, 18 mm contre 1,8 mm à la lumière (Gendreau *et al.*, 1997). Cet allongement ne reposant que sur l'élongation des cellules de l'hypocotyle et pas sur la division cellulaire (Gendreau *et al.*, 1997). Les cellules de l'épiderme de l'hypocotyle, les plus faciles à observer, multiplient leur taille par 10 lorsque la plantule pousse à l'obscurité. A l'obscurité totale l'hypocotyle pousse verticalement (géotropisme négatif) et ne produit pas de chlorophylle. La racine est également dépourvue de chlorophylle. Ces deux organes présentent donc des cellules en élongation faciles à observées puisque situées dans un organe relativement transparent et facile à monter entre lame et lamelle. En sus d'être pratiques à observer, ces cellules possèdent un réseau de microtubule à l'organisation bien définie, lors de l'élongation cellulaire, ce qui permet de détecter des modifications de cette organisation, même modeste.

2) Le contexte

Comme nous l'avons présenté précédemment, *Arabidopsis* possède trois gènes codant des orthologues de la protéine EB1. Les mutants de ces gènes présentent peu de phénotypes, même adulte. En effet, le seul phénotype observable est une déviation de la racine des jeunes plantes cultivées sur milieu gélosé. La racine principale d'*Arabidopsis* pousse de façon à suivre le vecteur de gravité (géotropisme positif) et est donc verticale lorsque les plantules poussent sur un milieu gélosé lui-même verticale. Chez les mutants de EB1a, b et c, la racine est systématiquement déviée de quelques degrés vers la droite (vue à travers le milieu). Le fait que cette déviation est lieu systématiquement du même côté est surprenant. Lorsque les boîtes dans lesquels poussent ces plantes sont tournées de 90°, vers la droite ou la gauche, les racines des mutants de EB1 sont capables de retrouver le vecteur de gravité (plus ou moins la déviation), ce qui indique que le gravitropisme n'est pas affecté. Par contre, les racines des mutants mettent plus de temps que celles de plantes sauvages à retrouver une croissance verticale après avoir rencontré un obstacle, ce qui indique que ces mutants sont hypersensibles au toucher (Bisgrove *et al.*, 2008, Gleeson *et al.*, 2012). De façon surprenante, aucune des études citées précédemment n'a relevé de phénotype sub-cellulaire concernant le réseau de microtubules dans les mutants de EB1 que ce soit au niveau de l'organisation du réseau ou de la dynamique des microtubules, à l'exception d'un effet faible sur la dynamique dans le mutant *eb1b-2* (Galva *et al.*, 2014).

3) Les objectifs de la thèse

Le premier objectif de cette thèse était d'identifier et de décrire les fonctions subcellulaires de EB1a et EB1b chez *Arabidopsis thaliana*. Le second objectif était de relier les fonctions sub-cellulaires de EB1a et EB1b au phénotype macroscopique décrit précédemment. Ayant mis en évidence un rôle de EB1 dans l'organisation du réseau de microtubules cortical et la formation de faisceaux de microtubules nous avons dans un troisième temps à exploré les fonctions intrinsèques de la protéine EB1b sur la dynamique des microtubules et examiné un potentiel effet synergique de EB1b et MAP65-1 sur la formation de faisceaux de microtubules.

Résultats

I) Organisation du réseau de faisceaux de microtubules corticaux chez les mutants de EB1 et de MAP65-1

1) Implication de EB1 dans l'organisation globale du réseau transverse

a) Observations qualitatives

Le réseau de microtubules cortical est impliqué dans l'élongation cellulaire et la synthèse de la paroi chez *Arabidopsis thaliana*. Ce réseau cortical guide notamment les enzymes de synthèse de la paroi et dicte la direction de l'élongation cellulaire. Connaissant ces rôles du réseau de microtubules, il était surprenant qu'aucun phénotype subcellulaire n'ait été rapporté chez les mutants de EB1 au vu du phénotype macroscopique de déviation de la racine vers la droite observé (Bisgrove *et al.*, 2008, Gleeson *et al.*, 2012). Nous avons donc, dans un premier temps, utilisé les lignées de plantes, générées par l'équipe du professeur T. Hashimoto (Komaki *et al.*, 2010), exprimant de façon stable de la tubuline-GFP pour observer le réseau de microtubules dans un contexte génétique sauvage ou double-mutant pour *eb1a* et *eb1b*. Chez les plantes double mutantes, l'expression du gène codant pour AtEB1a est abolie par l'insertion d'un tDNA et celle du gène AtEB1b par une mutation ponctuelle faisant apparaître un codon stop prématurément (voir Matériel et méthodes pour plus de détails) (Komaki *et al.*, 2010). Dans ces deux génotypes, nous nous sommes particulièrement intéressé à l'organisation du réseau cortical de microtubules dans les cellules en élongation puisque ce sont elles qui, par leur croissance, définissent la forme future des organes.

i. Désorganisation partielle du réseau de microtubules dans les cellules de l'hypocotyle

L'hypocotyle est un organe dont la croissance est très rapide à l'obscurité, particulièrement aisé à observer en microscopie confocale. Nous avons commencé nos investigations par l'analyse de l'organisation du réseau cortical de microtubules dans les cellules épidermiques en élongation de l'hypocotyle. Ces dernières, situées dans la partie la plus apicale de l'hypocotyle après 4 jours de croissance à l'obscurité, présentent, dans les plantes contrôles, un réseau de microtubules transverses, c'est-à-dire perpendiculaires à l'axe de croissance de la cellule et parallèles entre eux (Figure 22 A). Bien que globalement similaire au contrôle (35S::GFP-TuA6), nous avons constaté un désordre relatif au sein du

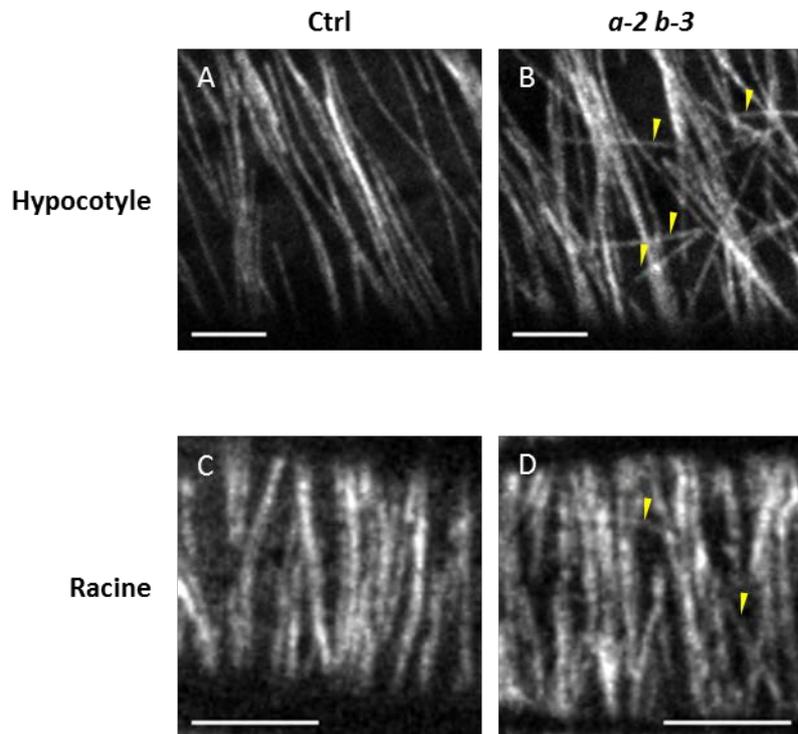


Figure 22 : Désorganisation du réseau cortical transverse de microtubule dans les cellules en élévation du double mutant *eb1a-2 eb1b-3*.

Réseau cortical de microtubules dans les cellules en élévation de plantes exprimant la construction 35S::GFP:TuA6 dans les fonds génétiques sauvages (Col-0) ou double mutant *eb1a-2 eb1b-3*.

(A et B) Cellules en élévation de l'hypocotyle.

(B et C) Cellules en élévation de la racine.

Les pointes de flèches jaunes indiquent des microtubules qui ne suivent pas le patron transverse et participent à la désorganisation du réseau.

Barre d'échelle : 5 μ m.

réseau de microtubules des plantes double-mutantes *eb1a-2 eb1b-3* (Figure 22 B). En effet, celui-ci présente un certain nombre de microtubules qui ne suivent pas l'organisation transverse.

ii. Désorganisation partielle du réseau de microtubules dans la racine

La désorganisation relative du réseau cortical de microtubule observée dans l'hypocotyle pourrait être une piste permettant d'expliquer le phénotype macroscopique racinaire si elle était aussi présente dans les cellules en élongation de la racine. Nous avons observé, dans les mêmes lignées, l'organisation du réseau cortical de microtubules dans les cellules épidermiques en élongation de la racine de plantes de 7 jours. L'expression de la construction rapporteur, et donc le marquage des microtubules, est meilleure dans les parties aériennes de la plante que dans la racine. Toutefois, nous avons pu constater que le phénotype subcellulaire observé dans l'hypocotyle est aussi présent dans la racine. Les cellules épidermiques en élongation des racines de plantes contrôles présentent un réseau transverse de microtubules. Celles de plantes *eb1a-2 eb1b-3* présente la même organisation transverse mais avec quelques microtubules ne suivant pas le patron global (Figure 22 C et D).

b) Comment quantifier l'organisation du réseau ?

Les observations réalisées sur le réseau cortical de microtubules dans l'hypocotyle et la racine indiquent que celui-ci est désorganisé dans les cellules en élongation. Toutefois, ces observations ne sont que qualitatives. Dans le but de valider ces observations, nous avons cherché une méthode de quantification de l'organisation du réseau de microtubules.

i. Utilisation de l'espace de Fourier

Le réseau transverse de microtubule présente un certain nombre de fibres parallèles, espacées de façon à peu près régulière (Figure 22). Ce type d'image contenant des éléments répétés régulièrement se prête bien à une analyse dans l'espace de Fourier. En effet, la transformée de Fourier permet de faire une analyse des fréquences présentes dans une fonction ou dans une image.

Une fonction à une dimension ($f(x)=y$) décrit la variation d'un signal (y) pour chaque valeur de x . La transformée de Fourier d'une fonction à une dimension permet d'obtenir une

nouvelle fonction décrivant le spectre de fréquences de la fonction $f(x)=y$. La représentation en spectre de fréquence montrera quelle proportion du signal y se trouve dans telle ou telle bande de fréquence.

Une image numérique est un tableau de données à 2 dimensions (x et y). Le spectre de puissance d'une image, obtenu en faisant la transformée de Fourier, décrit la façon dont le signal contenu dans l'image est distribué en fonction des fréquences (l'inverse de la période, c'est-à-dire la distance entre les éléments répétés). Lorsque la fonction « FFT (Fast Fourier Transform) » du logiciel ImageJ est utilisée on obtient une nouvelle image qui est la représentation du spectre de puissance de l'image analysée (les phases étant stockées ailleurs dans la mémoire de l'ordinateur). Dans cette nouvelle image, chaque pixel représente une fréquence selon un système de coordonnées polaires et la valeur de chaque pixel est proportionnelle à la quantité de signal de l'image initiale présentant une certaine fréquence. En d'autres termes, dans le spectre de fréquence obtenu, plus un pixel est brillant, plus la fréquence qui lui est associée est retrouvée dans l'image originale. Cette technique permet, lorsque l'on a une image présentant une périodicité, d'obtenir la fréquence de ce signal et de là de calculer la distance entre les objets répétés dans l'image.

Pour résumer l'approche, lorsqu'une image est composée de lignes, parallèles et périodiques (régulièrement espacées), les deux points les plus brillants de son spectre de fréquence sont alignés avec le centre de l'image (Figure 23 A et B). La droite formée par ces points, dans l'image du spectre de fréquence, est perpendiculaire à celles présentes dans l'image d'origine puisqu'elle représente l'axe le long duquel il y a une périodicité. La distance entre ces points est inversement proportionnelle à la périodicité des lignes dans l'image d'origine (Figure 23 A et B). Si, dans l'image originale, les droites ne sont pas exactement périodiques alors un couple de points apparaît sur le spectre de puissance pour chaque période dans l'image originale. Si les droites sont parallèles alors tous ces couples de points sont alignés (Figure 23 C). Maintenant, si les droites initiales sont périodiques mais ne sont pas exactement parallèles, alors un couple de points apparaît pour chaque orientation présente dans l'image originale et ces points se placent sur des droites perpendiculaires à ces différentes orientations (Figure 23 D).

Dans nos images biologiques, les microtubules ne sont jamais parfaitement parallèles entre eux, ni jamais parfaitement espacés. Le spectre de puissance est donc un nuage de

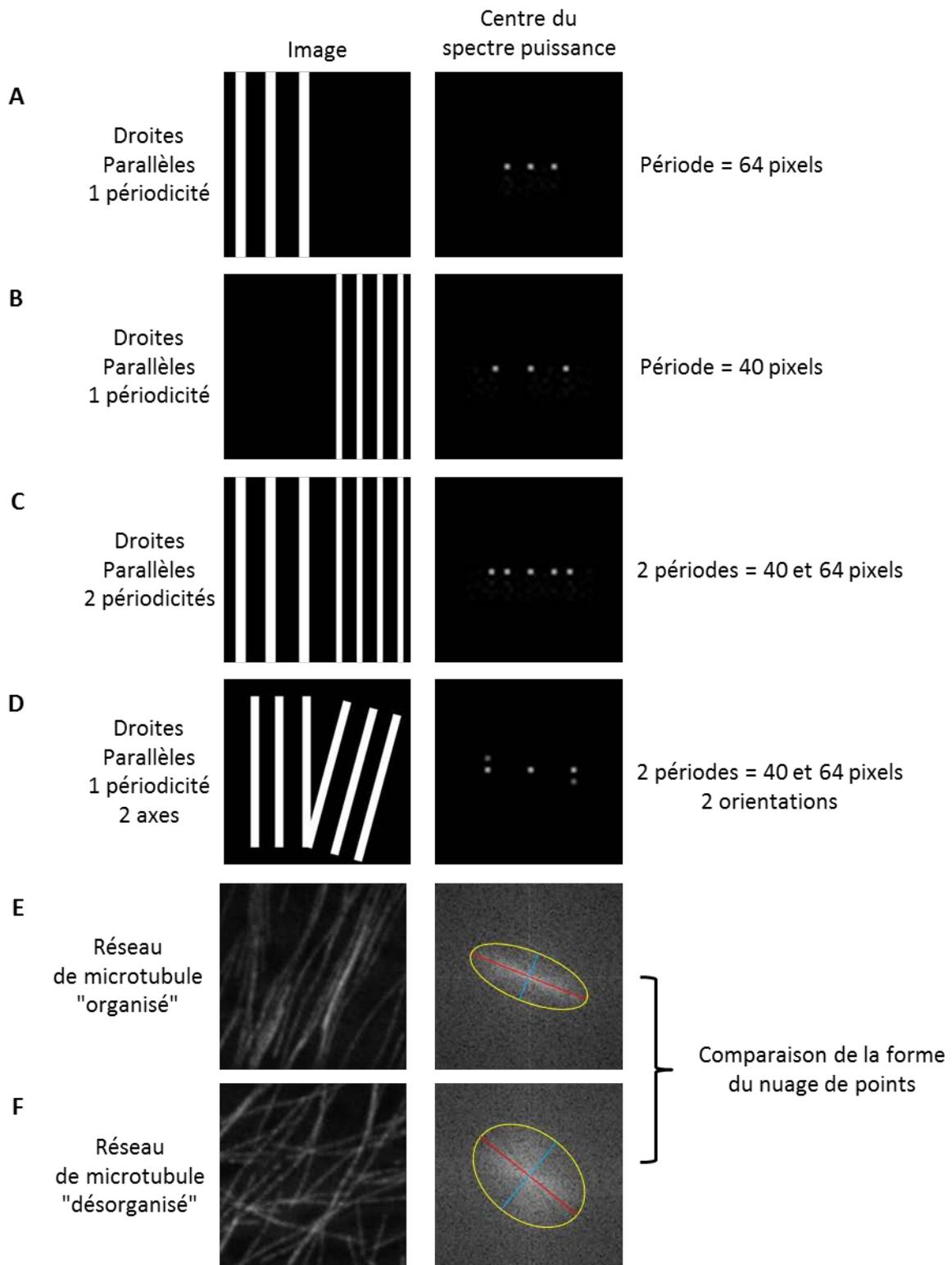


Figure 23 : Quantification de l'organisation du réseau de microtubule fondée sur la transformée de Fourier.

points, symétrique et centré sur le centre image (Figure 23 E et F). Malgré tout, les propriétés de ce nuage de points reflètent la géométrie des éléments contenus dans l'image biologique. Plus le nuage de point est allongé, plus il ressemble à une droite, plus le réseau de microtubule analysé est parallèle et donc organisé. A l'inverse, plus le réseau est désorganisé, avec plusieurs axes présentant des périodicités, plus le nuage de points tendra vers une forme arrondie. En utilisant ces propriétés, il est donc envisageable d'estimer l'organisation d'un réseau de microtubules en analysant la forme du nuage de points présents dans le spectre de puissance (Figure 23 E et F).

La mise en œuvre de cette méthode d'estimation sur nos données d'imagerie confocale s'est révélée peu concluante. En effet, bien que les nuages de points présentent des différences assez marquées lorsque les réseaux de microtubules sont très différents, la sensibilité de cette méthode est assez basse et n'a pas permis de mettre en évidence de différence notable entre les deux génotypes. Le défaut de sensibilité de cette méthode provient probablement de l'étape de seuillage employée pour détecter et étudier la forme du nuage de points plutôt que de l'utilisation même de l'espace de Fourier.

ii. Quantification basée sur l'anisotropie du réseau de microtubules

Alors que nous cherchions un autre moyen de quantifier la désorganisation du réseau de microtubules observée chez le double mutant, un plug-in du logiciel ImageJ permettant de réaliser de façon efficace, simple et performante ce genre d'analyse a été publié (Boudaoud *et al.*, 2014). Ce plug-in, appelé par ces créateurs FibrilTool permet d'analyser l'organisation d'un réseau de fibre à partir d'image (objet en 2 dimensions). Plutôt que d'utiliser une transformation de Fourier, FibrilTool s'inspire de la physique des cristaux liquides. La méthode détecte les fibres en suivant le gradient d'intensité existant entre la fibre et le fond de l'image. A chaque fibre est associé un vecteur qui lui est tangent. Ensuite, la moyenne des orientations des vecteurs dans le plan de l'image définit l'orientation moyenne des fibres et la variance de l'orientation des vecteurs permet de définir un score d'anisotropie. L'anisotropie rend ainsi compte de l'organisation du réseau de fibres. Théoriquement, l'anisotropie peut varier entre 0 et 1 : une valeur de 0 indiquant un réseau complètement isotrope (désorganisé) et une valeur de 1 un réseau parfaitement parallèle. Ce plug-in nous a permis de quantifier l'anisotropie du réseau de microtubules dans les cellules de plantes contrôles et double-mutantes *eb1a-2 eb1b-3*. Toutefois, les images biologiques ne permettent pas d'obtenir des

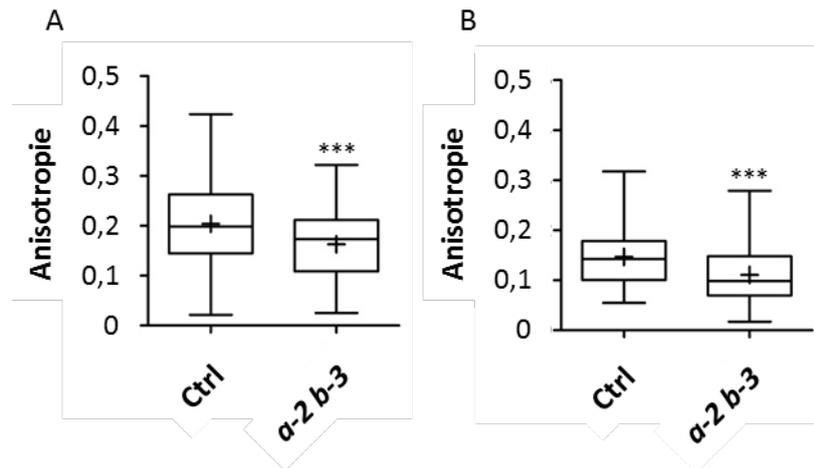


Figure 24 : Anisotropie du réseau cortical de microtubules dans les cellules en élongation du double mutant *eb1a-2 eb1b-3*.

Anisotropie du réseau cortical de microtubules, mesurée avec le plug-in FibrilTool (Boudaoud *et al.*, 2014) dans des images similaires à celle de la Figure 1, dans des plantes contrôle (35S::GFP:TuA6) et double mutant *eb1a-2 eb1b-3*.

(A) Anisotropie mesurée dans les cellules épidermiques en élongation de l'hypocotyle. n=109 et 107 cellules provenant de 10 plantes pour le contrôle et le double mutant respectivement.

(B) Anisotropie mesurée dans les cellules épidermiques en élongation de la racine. n=132 et 112 cellules provenant de 12 plantes pour le contrôle et le double mutant respectivement.

Les différences sont significatives d'après un test de Mann-Whitney dans l'hypocotyle (A) $p=0,0009$ et la racine (B) $p<0,0001$.

valeurs d'anisotropie très élevées, même lorsque le réseau semble très bien organisé à l'œil. La qualité des images (multiples bruits lors de l'acquisition de l'image) et la variabilité biologique font que les valeurs moyennes d'anisotropie dans les cellules contrôles ne dépassent pas 0,2. Les moyennes obtenues dans les cellules du double-mutant, que ce soit dans l'hypocotyle (0,16 +/- 0,07) ou la racine (0,11 +/- 0,05) (moyenne +/- écart-type) sont inférieures à celles obtenues chez les plantes sauvages dans les mêmes organes (0,20 +/- 0,08 et 0,15 +/- 0,05 respectivement). Ces différences d'anisotropie sont significatives d'après un test de Mann-Whitney (Figure 24).

L'analyse des images et la quantification de l'organisation des réseaux de microtubules chez les plantes contrôles et double-mutante *eb1a-2 eb1b-3* confirment donc nos premières observations ; le réseau cortical de microtubule est partiellement désorganisé en absence de EB1a et de EB1b. Bien que cette désorganisation soit légère, elle est visible à l'œil nu et significative.

2) Désorganisation de la paroi cellulaire chez le double mutant *eb1a-2 eb1b-3*.

Les microtubules sont impliqués dans la synthèse et l'organisation quasi cristalline de la paroi végétale. Ils permettent et guident le mouvement des enzymes membranaires responsable de la synthèse des microfibrilles de cellulose (Bringmann *et al.*, 2012, Sotiriou *et al.*, 2016). Nous avons exploré l'organisation de la paroi cellulaire chez les mutants de EB1 dans le but de confirmer ou non la désorganisation du réseau cortical de microtubules. Estimer l'organisation de la paroi végétale nécessite de pouvoir observer les fibres de cellulose et hémicellulose qui la composent. Plusieurs techniques, plus ou moins difficiles à mettre en œuvre, existent et permettent de le faire. Ces techniques vont de la simple coloration par une molécule ayant une affinité pour certains composants de la paroi à la microscopie électronique en passant par la spectroscopie infrarouge ou encore la microscopie à force atomique.

La première de ces techniques, la coloration par une molécule affine pour la paroi (Pontamine Fast Scarlet) n'a pas permis, entre nos mains, d'obtenir des images de qualité suffisante pour voir les fibres pariétales comme ça pu être fait dans d'autres études (Liesche *et al.*, 2013, Anderson *et al.*, 2010). Avant de se lancer dans des techniques nécessitant la mise en place de protocoles assez lourds comme la microscopie électronique ou à force atomique, nous souhaitons nous assurer qu'il y avait ou non un phénotype pariétal.

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy FT-IR) permet d'analyser la paroi végétale de façon globale et donne des informations sur l'organisation de la paroi mais également sur sa composition. Cette technique repose, dans notre cas, sur l'obtention d'un spectre de réflexion de la lumière infrarouge en fonction de la longueur de cette dernière. La réflexion entre 1830 cm^{-1} et 1000 cm^{-1} est caractéristique d'une liaison moléculaire et varie en fonction de son abondance alors qu'entre 1000 cm^{-1} et 800 cm^{-1} la variation de la réflexion est plutôt due à l'organisation des liaisons moléculaires.

En collaboration avec le Dr Grégory Mouille (IJPB, INRA Versailles) nous avons analysé par FT-IR la paroi de notre double mutant, en la comparant avec des plantes contrôle. Nous avons pu obtenir des analyses dans trois zones de l'hypocotyle : (1) la zone apicale (le tiers supérieur) dans laquelle les cellules sont en élongation et qui est celle dans laquelle nous avons observé une désorganisation du réseau cortical de microtubule, (2) la zone centrale et (3) la partie basse de l'hypocotyle où les cellules ont fini de croître et dans lesquels le réseau de microtubules est longitudinal. L'analyse des cellules en élongation de la racine n'a pas pu être faite en FTIR car la zone d'élongation ne représente qu'une toute petite portion de la racine d'une plante de 7 jours.

L'analyse en FT-IR n'a pas pu être réalisée sur les lignées de plantes exprimant la GFP car la présence d'une protéine fluorescente en quantité non-négligeable dans l'échantillon peut perturber l'acquisition des données. Pour ces expériences nous avons donc croisés les simples mutants *eb1a-2* et *eb1b-3* ensemble afin de générer un double mutant n'exprimant pas de tubuline-GFP. Les résultats obtenus en FTIR sont représentés en figure 3 sous forme de courbes montrant la p-value de la différence entre les spectres obtenus chez les plantes sauvages et chez les plantes mutantes en fonction du nombre d'onde (l'inverse de la longueur d'onde). La zone du graphique qui est grisée entre les lignes horizontales +2 et -2 représente la zone de non significativité du test statistique, de sorte que chaque portion de la courbe en dehors de cette zone révèle une différence significative entre sauvage et double mutant.

La comparaison des simples mutants *eb1a-2* et *eb1b-3* et du double mutant *eb1a-2 eb1b-3* au sauvage (Col-0) révèle une différence significative à 990 cm^{-1} indiquant que la paroi du double mutant est désorganisée comparée à celle du sauvage, dans la partie supérieure de l'hypocotyle. Ce pic n'est pas significatif pour les simples mutants. Chez le

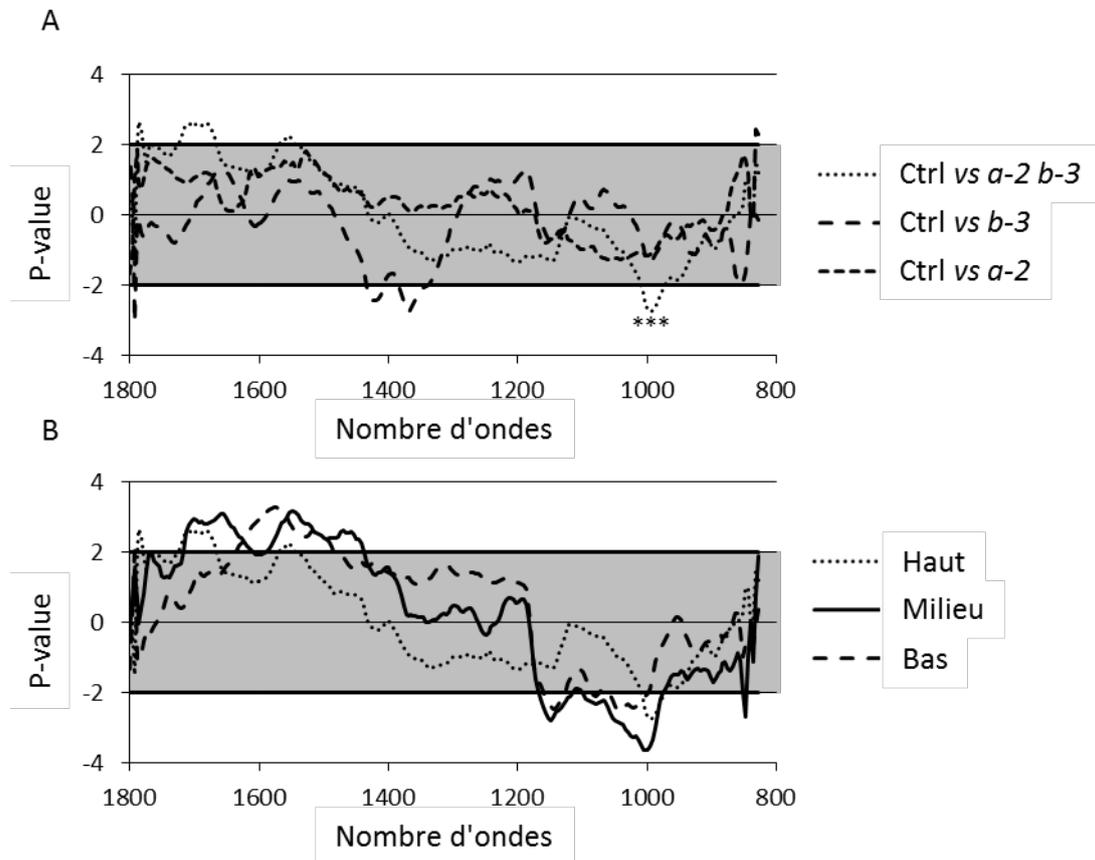


Figure 25 : Spectres FT-IR de la paroi de l'hypocotyle de mutants de EB1.

Spectres FT-IR (nombre d'onde) en fonction de la significativité (p-value).

(A) Le spectre FT-IR comparant la paroi, dans la partie haute de l'hypocotyle (cellules en élongation), révèle une désorganisation de la paroi du double mutant *ebla-2 eblb-3* à 990 cm^{-1} qui n'apparaît pas dans les simples mutants *ebla-2* et *eblb-3*.

(B) Le spectre FT-IR comparant les parties haute, centrale et basale de l'hypocotyle du double mutant *ebla-2 eblb-3* indique que la désorganisation pariétale présente en haut de l'hypocotyle semble disparaître en bas de l'hypocotyle.

Spectres moyens issus de l'acquisition du 20 spectres à partir de 5 hypocotyles observés lors de chacune des 4 répétitions biologiques.

double mutant, la désorganisation de la paroi semble amplifiée dans la zone centrale de l'hypocotyle mais n'est pas retrouvée dans les cellules du bas de l'hypocotyle, ce qui indique que des mécanismes de compensations pourraient corriger les défauts apparus lors de l'élongation (Figure 25).

3) Diminution du nombre de microtubules par faisceau en absence de AtEb1 a et AtEb1b.

Le réseau de microtubules est désorganisé en absence des protéines EB1a et de EB1b. Or, nous l'avons évoqué dans l'introduction, la formation des faisceaux de microtubules joue un rôle important dans l'organisation du réseau cortical des cellules végétales. Dans le but d'avoir une meilleure description du réseau de microtubules et de voir si la formation des faisceaux pouvait être affectée chez le double mutant *eb1a-2 eb1b-3*, nous avons utilisé la microscopie super-résolue de type STED (Stimulated Emission Depletion).

a) Le STED, une méthode de super-résolution de choix pour des échantillons vivants

Il existe de nombreuses techniques de microscopie à super-résolution. Chacune de ces techniques représente un compromis entre le gain de résolution obtenu, la complexité de mise en œuvre nécessaire et la photo-toxicité ou la lenteur d'acquisition selon la méthode choisie. Ainsi, l'illumination structurée (Structured illumination (SIM)) fonctionne sur presque tous les échantillons exprimant une protéine fluorescente et permet d'améliorer la résolution latérale de 50 %. Alors que les techniques de pointillisme, telle que le STORM (Stochastic Optical Reconstruction), ne fonctionnent que sur la surface d'échantillons fixés mais permettent d'atteindre des résolutions de l'ordre de la dizaine de nanomètres. Nous avons choisi d'utiliser la technique du STED (Stimulated Emission Depletion) car elle est compatible avec des échantillons vivants, elle fonctionne avec la GFP et permet un gain de résolution théorique d'un facteur 2 à 10.

Le STED repose sur la capacité de la GFP à émettre de la lumière suite à son excitation due à l'absorption de lumière bleue. Une fois excitée, la GFP est capable d'émettre des photons pour revenir à son état stable. Cette émission peut être spontanée ou stimulée. L'émission spontanée, la plus classique, celle qui donne lieu à la fluorescence, a lieu à chaque fois que la protéine est excitée par de la lumière bleue. L'émission stimulée n'a lieu que

lorsque la protéine est illuminée, alors qu'elle est dans son état excité, par des photons dont la longueur d'onde est proche mais différente de ceux émis en fluorescence. En résumé, et en simplifiant le propos, la GFP absorbe des photons à 491 nm pour passer dans un état excité. Elle émet ensuite des photons à 510 nm lors de son émission spontanée pour retourner à son état stable. L'illumination de la protéine excitée avec de la lumière à 592 nm va provoquer l'émission de photons à 592 nm (émission stimulée) en lieu et place de ceux à 510 nm (émission spontanée) lors du retour de l'état excité à l'état stable. Le STED se sert de cette propriété physique de la GFP en utilisant un second laser, en plus du laser d'excitation utilisé en microscopie confocale. Ce second laser, appelé laser de déplétion a une longueur d'onde de 592 nm et éclaire une zone en forme de tore, centrée sur le point focal du laser d'excitation. Dans la zone périphérique, celle illuminée par les deux lasers, la GFP va absorber les photons à 491 nm du laser d'excitation et va émettre, sous l'action du laser de déplétion, des photons à 592 nm au lieu de ceux à 510 nm. Dans la zone centrale, l'émission stimulée n'a pas lieu puisque le laser de déplétion ne l'illumine pas. Dans cette zone, c'est l'émission spontanée de photons à 510 nm qui domine. La superposition de ces deux lasers permet au microscope STED de réduire le volume de la zone centrale (au-delà de ce que les lois de l'optique permettent) et donc d'augmenter la résolution en réduisant la taille de la zone fluorescente (Figure 26).

b) Observations qualitatives

Le STED repose sur l'utilisation d'un laser de déplétion qui doit être très puissant pour que dans la zone qu'il éclaire toutes les molécules de GFP se relâchent systématiquement par de l'émission stimulée et jamais par de l'émission spontanée. De ce fait, la plupart des molécules de GFP présentent dans la zone à imager ne participent pas à l'obtention de signal. De plus, étant très puissant, ce laser provoque beaucoup de photo-blanchiment. Une proportion non négligeable des molécules de GFP illuminées par le laser de déplétion va être photo-détruite. Comme nous l'avons dit en partie 1, la racine exprime moins de tubuline-GFP que la partie aérienne. La différence d'expression est suffisante pour nous empêcher d'acquérir des images STED dans la racine. De ce fait, les images STED proviennent toutes de cellules épidermiques d'hypocotyles étiolés.

Dans notre cas, l'utilisation du STED et de la déconvolution a permis un gain de résolution. Bien que l'on n'atteigne probablement pas les résolutions théoriques, ce gain de

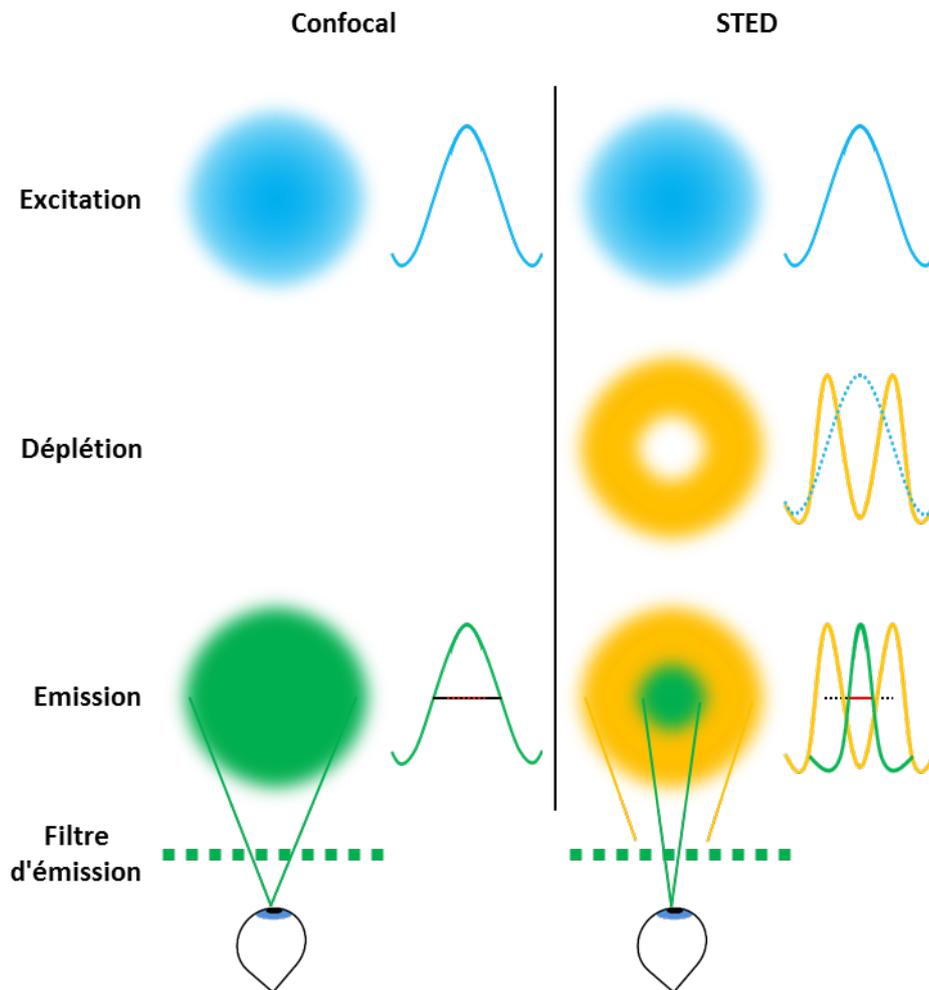


Figure 26 : Principe de la microscopie STED.

La visualisation de la GFP en microscopie confocale repose sur l'emploi d'un laser d'excitation (491 nm).

La microscopie STED repose sur l'utilisation de deux lasers, un laser d'excitation (491nm) et un laser de déplétion (592 nm). Le laser de déplétion éclaire une zone torique et empêche l'émission de fluorescence par la GFP. La superposition de ces deux lasers restreint la zone dans laquelle la GFP peut émettre de la fluorescence et permet en conséquence d'améliorer la résolution latérale.

résolution nous a permis d'observer et de décrire les faisceaux de microtubules corticaux. En effet, l'acquisition en STED a été immédiatement suivie d'une acquisition en mode confocal classique. La comparaison des deux images montre que certains filaments observés en confocal apparaissent comme étant plusieurs microtubules en STED. Ces microtubules qui semblent associés latéralement dans un espace inférieur à 300 nm le sont sûrs de grande longueur de sorte que nous pouvons les considérer comme étant des faisceaux de microtubules. Nous avons pu observer plus de ces faisceaux de microtubules dans les cellules contrôles que dans les cellules mutantes. Ce résultat très qualitatif demandait à être confirmé par une analyse quantitative (Figure 27).

c) Comment estimer le nombre de microtubules par faisceau ?

Une fois que nous nous étions convaincu, par l'observation de nombreuses plantules, des résultats qualitatifs décrits précédemment, il nous a fallu mettre en place une méthode de quantification. Les images STED ayant une meilleure résolution que les images confocales nous avons décidé de les utiliser pour quantifier l'occurrence des faisceaux.

i. Utilisation des distances intra et inter faisceaux

L'idée était de tracer une droite perpendiculaire au réseau de microtubules et de mesurer ensuite les distances entre les microtubules le long de cette droite (Figure 28). L'obtention de ces distances entre microtubules consécutifs n'a pas été l'étape la plus compliquée à développer.

Brièvement, après avoir mesuré l'orientation moyenne des microtubules une droite perpendiculaire à cette orientation moyenne et passant par le centre de l'image est tracée. L'intensité de fluorescence le long de cette droite est relevée. Le calcul de la première puis de la seconde dérivée du signal fluorescent permet de trouver la position de chaque microtubule traversé par la droite. Une fois ces distances obtenues, l'analyse de leur distribution permet de trouver la distance moyenne entre microtubules d'un faisceau. En effet, la distribution doit être une bimodale dont le premier mode correspond à la distance « intra-faisceaux » et le second mode à la distance « inter-faisceaux ». La distance moyenne entre microtubules d'un faisceau calculée chez les plantes contrôles nous sert ensuite de seuil pour compter le nombre de fois deux microtubules sont espacés d'une distance inférieure à ce seuil et ainsi dénombrer

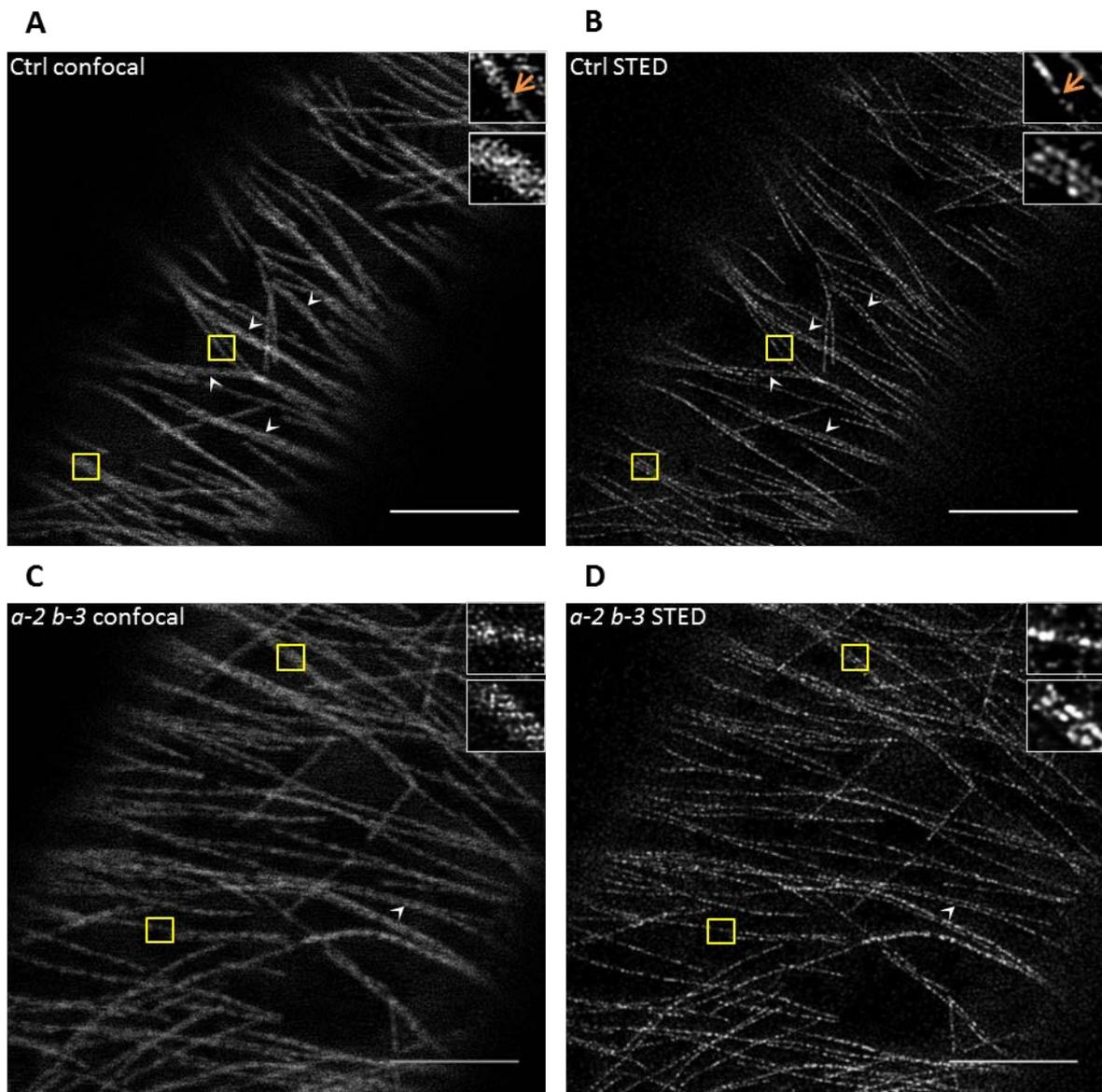


Figure 27 : Le réseau de microtubule cortical du double mutant présente moins de faisceaux de microtubules.

Acquisition à quelques secondes d'intervalle d'images de la même cellule en microscopie confocale et en microscopie STED dans de l'épiderme d'hypocotyle étioilé.

(A et B) Cellule de plante contrôle (35S ::GFP :TuA6).

(C et D) Cellules du double mutant *eb1a-2 eb1b-3*.

Le STED permet d'observer des faisceaux de microtubules (pointes de flèches blanches sur les images et encarts en haut à droites) chez les plantes contrôle et double mutante *eb1a-2 eb1b-3*.

Barre d'échelle 5 μ m.

les « vrais » faisceaux chez le contrôle et le double mutant. Cette approche a été infructueuse en raison d'une distribution inattendue des distances. En effet, la résolution latérale des images STED ne permettait pas d'échantillonner correctement les distances intra-faisceaux, bien souvent les microtubules d'un faisceau n'étant séparés que par 1 ou 2 pixels. Puisqu'une analyse statistique de la distribution des distances n'était pas possible, nous avons cherché à déterminer ce seuil de distance au delà duquel 2 microtubules ne forment plus un faisceau, mais deux entités séparées. Les données disponibles dans la littérature indiquent que la distance entre deux microtubules adjacents d'un faisceau varie de 15 à 30 nm suivant la protéine responsable de la formation du faisceau. Cependant, ces distances étant plus petites que la résolution atteinte avec nos images STED, elles n'étaient pas utilisables dans notre analyse. En dernier recours, puisque nous avons la capacité de compter le nombre de faisceaux traversés par la droite verticale, en comparant les images STED et confocales, il nous était possible de déterminer manuellement la valeur seuil. Pour ce faire il suffisait de choisir une distance seuil qui permettait d'obtenir un nombre de faisceaux par cellules le plus proche possible de ce que l'on obtenait en les comptant à la main. Toutefois, cette méthode nécessitait un comptage manuel des faisceaux et un ajustement de la valeur seuil pour faire correspondre approximativement la quantification à la réalité, ce qui n'est pas satisfaisant.

ii. Utilisation de l'intensité du signal fluorescent pour estimer le nombre de microtubules par faisceau

Après ces premières déconvenues, nous avons cherché une autre méthode permettant d'estimation du nombre de microtubules par faisceau. Cette fois-ci, plutôt que de partir de la distance entre microtubules successifs obtenue sur les images STED, nous avons cherché à quantifier la quantité de fluorescence contenue dans chaque faisceau de microtubules. Pour ce faire, plutôt que de tracer la droite perpendiculaire au réseau sur l'image STED nous avons utilisée l'image confocale. Nous avons mesuré l'intégrale d'un profil de fluorescence perpendiculaire à des portions de microtubules sélectionnés à la main (voir Matériel et méthodes) (Annexe 2). Cette méthode est inspirée de Einsinger et al. 2012 a et b, mais en utilisant l'intégrale du signal plutôt que le maximum du profil d'intensité, ce qui permet de prendre en compte l'ensemble des microtubules du faisceau. La méthode a été semi-automatisée par l'écriture d'un script dans ImageJ. Une fois les intégrales mesurées, nous avons fait le postulat que vu le grand nombre de faisceaux analysés (270 pour le contrôle et 276 pour le double-mutant), l'intégrale la plus faible devait correspondre à un microtubule

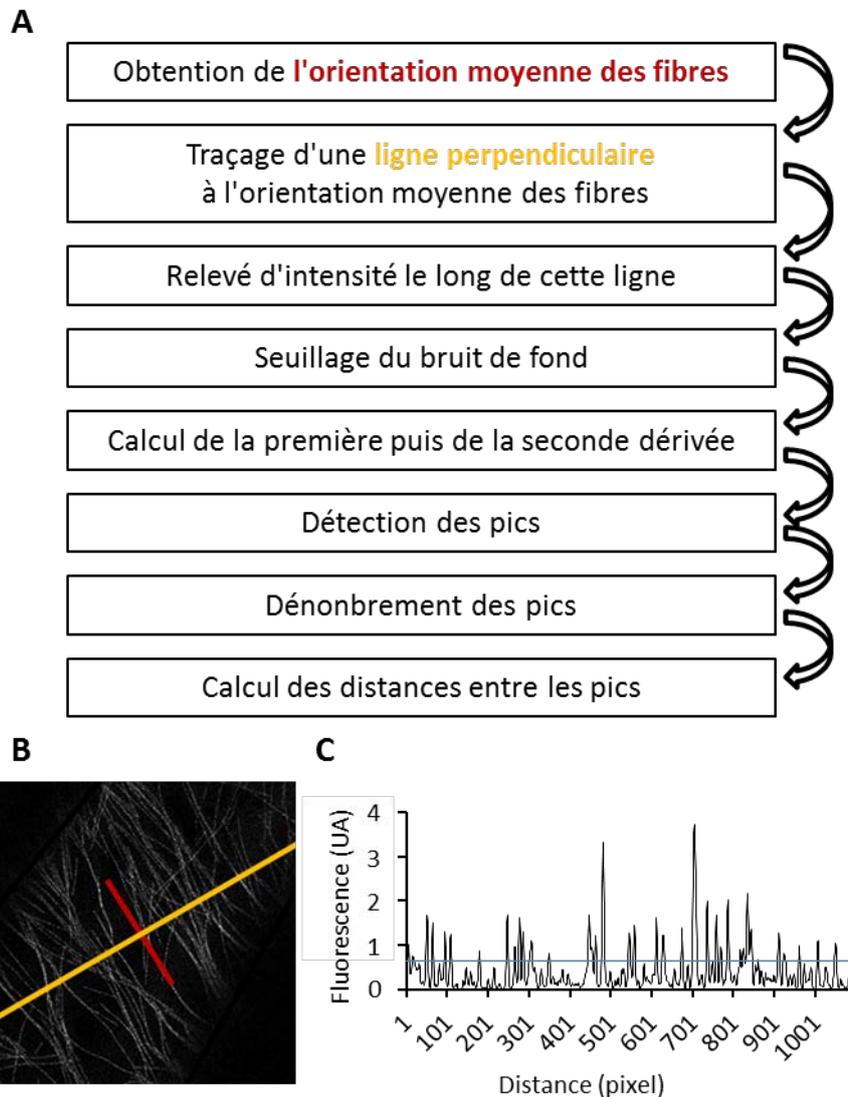


Figure 28 : Principe de la méthode de comptage du nombre de faisceaux.

(A) Le plug-in FibrilTool d'ImageJ (Boudaoud *et al.*, 2004) est utilisé pour obtenir l'orientation moyenne des microtubules d'une image STED (ligne rouge sur l'image (B)). Une droite perpendiculaire à cette orientation moyenne est tracée (ligne jaune sur l'image (B)). La fluorescence le long de cette droite est relevée (C). Le bruit de fond de l'image est estimé et soustrait au profil de fluo (droite bleue sur l'image (C)). La seconde dérivée du profil de fluorescence est utilisée pour détecter et compter les pics. La distance entre les pics est calculée.

isolé et non à un faisceau de microtubules. Ce postulat nous a permis de normaliser les intégrales en les divisant par la plus petite d'entre elles. Le résultat de ce ratio est une estimation du nombre de microtubules dans le faisceau. Puisque nous disposons des images STED obtenues quelques secondes avant les images confocales, nous avons pu vérifier que les estimations ainsi obtenues étaient cohérentes avec l'image super-résolue du faisceau correspondant (Figure 29). La comparaison des images confocales, des images STED et de l'estimation du nombre de microtubules dans le faisceau montre que l'estimation est cohérente à la fois pour les microtubules isolés et les faisceaux.

d) Estimation de l'occurrence des faisceaux chez les plantes contrôles et double mutant.

Puisque nous avons réussi à développer une méthode permettant d'estimer le nombre de microtubules dans chaque faisceau, nous pouvons estimer l'effet de la mutation de *EB1a* et de *EB1b* sur la taille des faisceaux. Le nombre moyen de microtubules par faisceaux chez les plantes contrôles est de $2,38 \pm 0,56$. Bien que cette valeur soit très proche de celle obtenue chez le double mutant, $2,17 \pm 0,51$, la différence est statistiquement significative d'après un test de Mann-Whitney ($p < 0,0001$). De plus, la distribution du nombre de microtubules par faisceau révèle que chez les plantes contrôles un tiers des faisceaux comptent plus de 2 microtubules (35,64%) alors que cette proportion chute à 1 sur 5 chez le double mutant (20,83%). Les deux distributions sont significativement différentes d'après un test de Chi² avec $p=0.0006$ (Figure 30). Ces résultats indiquent que le nombre de microtubules par faisceau est réduit dans le réseau cortical de microtubules des cellules épidermiques en élongation de l'hypocotyle chez le double mutant *eb1a-2 eb1b-3* en comparaison des plantes contrôle, n'exprimant que la chimère GFP-tubuline.

4) Désorganisation du réseau cortical et diminution du nombre de microtubules par faisceau en absence de MAP65-1

EB1 semble être impliquée dans l'organisation et la formation ou la maintenance des faisceaux de microtubules dans le réseau cortical des cellules épidermiques de l'hypocotyle. Sachant que MAP65-1 participe à la formation des faisceaux *in vitro* (Portran *et al.*, 2013), nous avons analysé l'organisation des microtubules chez un mutant perte de fonction de MAP65-1 (par insertion d'un ADNt dans le gène) afin d'explorer le lien potentiel entre taille des faisceaux et organisation du réseau.

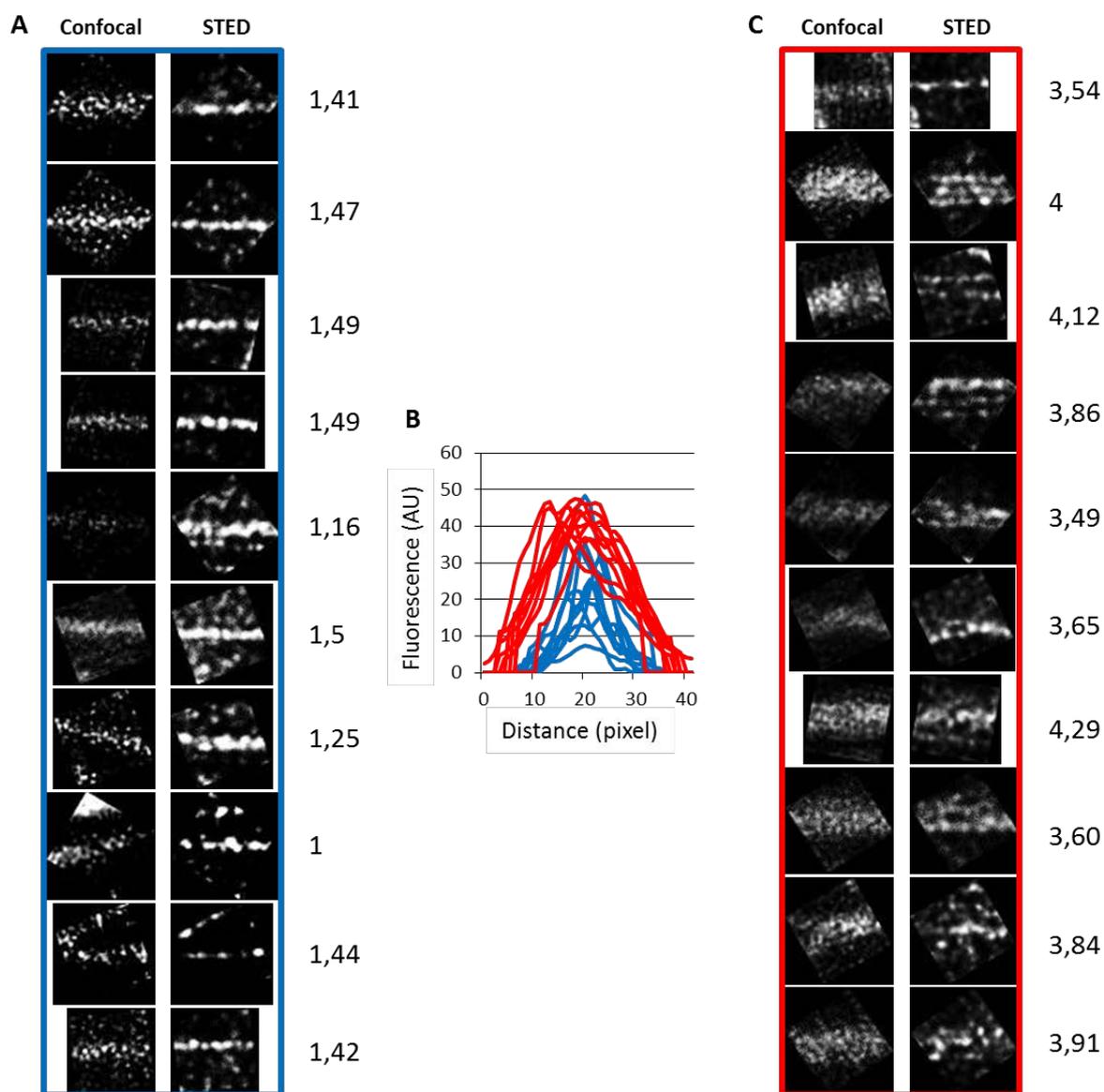


Figure 29 : Principe de la quantification du nombre de microtubules par faisceau fondée sur la mesure de l'intégrale du signal fluorescent.

Les 10 faisceaux ayant les intégrales les plus petites apparaissent comme des microtubules isolés en STED (A). Les dix faisceaux ayant les intégrales les plus grandes (C) apparaissent la plupart du temps comme étant composés de plusieurs microtubules. (B) les intégrales des microtubules en (A) sont inférieures à celles des microtubules en (C).

En divisant la valeur de l'intégrale de chaque microtubule par la plus petite intégrale mesurée on estime le nombre de microtubules par faisceaux. L'estimation ainsi obtenue est cohérente avec les images STED que ce soit pour les faisceaux contenant 1 microtubule (A) ou plusieurs (C). Le nombre de microtubules par faisceaux est donc proportionnel à l'intégrale du signal fluorescent.

a) Nombre de microtubules par faisceau

La méthode d'estimation du nombre de microtubules par faisceaux décrite précédemment est fondée sur les profils de fluorescence obtenus en microscopie confocale classique ; méthode que nous avons validée en corrélant les valeurs obtenues avec des images super-résolues de microscopie STED. Aussi, avons nous directement estimé le nombre de microtubules par faisceau chez le mutant MAP65-1 en analysant des images de microscopie confocale classique (Annexe 3).

Pour cette expérience, nous avons comparé deux lignées de plantes exprimant de façon stable la tubuline- α -6 fusionnée à la GFP (de façon identique aux mutant *eb1a-2 eb1b-3*) dans deux contextes génétiques différents. La première lignée contient un tDNA inséré dans le gène codant pour MAP65-1, la seconde lignée est la complémentation fonctionnelle de la première, et contient en plus de la mutation, un tDNA permettant l'expression de la protéine MAP65-1-mCherry sous le contrôle de son propre promoteur (Don du Dr. M. Vantard). La distribution des faisceaux de microtubules en fonction du nombre de microtubules qu'ils contiennent révèle que la lignée *map65-1* présente un défaut de formation des faisceaux. En effet, comparée à la lignée complémentée, la proportion de faisceaux contenant au moins 2 microtubules chute chez le mutant de MAP65-1 (Figure 31), confirmant le rôle de cette protéine dans la formation des faisceaux publiées auparavant *in vitro* (Portran *et al.*, 2013). L'absence de MAP65-1 semble donc occasionner un phénotype similaire à celui causé par les mutations de EB1 a et EB1 b.

b) Organisation des faisceaux en réseau

En utilisant la même méthode de quantification fondée sur le calcul de l'anisotropie de distribution des fibres (utilisation du plug-in FibrilTool), nous avons examiné l'organisation du réseau cortical de microtubules dans les cellules épidermiques en élongation de l'hypocotyle de plantules étiolées de 4 jours. Les plantes *map65-1* présentent une anisotropie moyenne (0,11+/- 0,05) inférieure à celle des plantes complémentées (0,16 +/- 0,07), indiquant une désorganisation du réseau de microtubules (Figure 32 B). De la même façon que pour le double mutant *eb1a-2 eb1b-3*, bien que désorganisé, le réseau présente quand même l'organisation globale transverse attendue (Figure 32 A). En comparaison avec les lignées 35S::GFP:TuA6 et double mutante *eb1a-2 eb1b-3* 35S::GFP:TuA6, les lignées

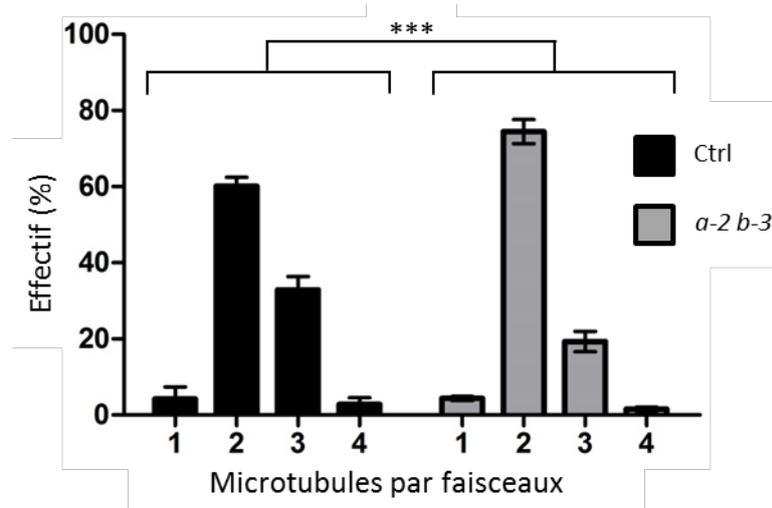


Figure 30 : Le nombre de microtubules par faisceaux est réduit chez le double mutant *eb1a-2 eb1b-3*.

Répartition des faisceaux en fonction du nombre de microtubules qu'ils contiennent chez les plantes contrôles et double mutant. La différence entre les deux distributions est significative d'après un test du Chi² $p=0,0006$. $N= 270$ et 276 faisceaux provenant de 29 plantes et de 3 répétitions biologiques pour le contrôle et le double mutant respectivement.

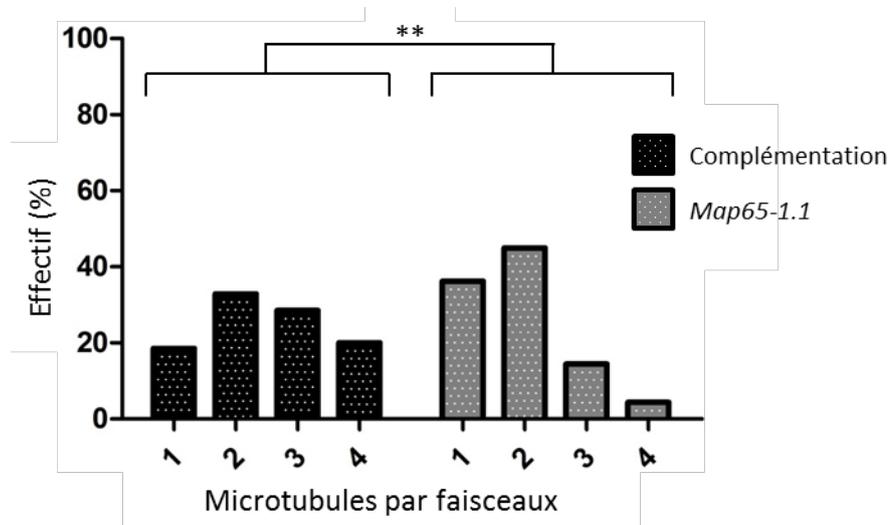


Figure 31 : Le nombre de microtubules par faisceaux est réduit chez le mutant *map65-1.1*.

Répartition des faisceaux en fonction du nombre de microtubules qu'ils contiennent chez les plantes contrôle et double mutant. La différence entre les deux distributions est significative d'après un test du Chi² $p=0,0015$. $n= 80$ et 78 faisceaux, provenant de 11 et 15 plantes pour la lignée complétementée et la lignée *map65-1* respectivement.

map65-1 et complétement présentent une anisotropie légèrement plus faible. Toutefois la différence d'anisotropie entre *map65-1* et sa lignée complétement, d'environ 30%, est comparable avec la différence constatée entre le double mutant et son contrôle de l'ordre de 20%.

II) Dynamique des microtubules et organisation du réseau

1) Instabilité dynamique des microtubules chez le double mutant *eb1b-2 eb1b-3* et chez le mutant *map65-1*

Comme nous l'avons vu en introduction (cf. Chapitre 2), la dynamique du réseau de microtubule participe à son organisation. Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les phénotypes de désorganisation du réseau et de défauts de faisceaux constatés précédemment, il est indispensable de mesurer l'instabilité dynamique chez les mutants de EB1 et de MAP65-1. Nous avons suivi la dynamique des microtubules, dans les lignées exprimant la tubuline-GFP, en réalisant des acquisitions dans les cellules en élévation de l'hypocotyle étiolé, chaque 2 secondes, sur des durées de 5 minutes. Les films obtenus permettent de mesurer les vitesses de polymérisation et de dépolymérisation des microtubules et de calculer les fréquences de transitions à partir de kymographes. Un kymographe est une projection du déplacement d'un objet (ici l'extrémité (+) des microtubules) le long d'une trajectoire au cours du temps (Figure 33 B). Cette représentation révèle le comportement de l'extrémité (+) des microtubules sous forme de pentes, séparées par des « pics » ou des « vallées ». Les pics et les vallées représentent respectivement les événements de catastrophe et de sauvetage. Les pentes résultent soit de l'allongement soit du raccourcissement du filament au cours du temps et leur dérivé est donc une vitesse de polymérisation ou de dépolymérisation (Figure 33 C).

Le réseau cortical de microtubules est très dense en microtubules et ceux-ci sont bien souvent associés en faisceaux. Suivre le comportement de l'extrémité (+) d'un microtubule dans un réseau aussi dense n'est pas facile. Nous avons décidé, inspiré par Yulia et al. 2002, de photo-blanchir une zone d'intérêt avant de réaliser nos acquisitions de façon à suivre plus facilement la dynamique des microtubules. Malgré le photo-blanchiment, dans le réseau cortical d'*Arabidopsis thaliana*, les microtubules étant souvent associés en faisceaux, la lecture des kymographes est compliquée puisque de nombreux microtubules se superposent.

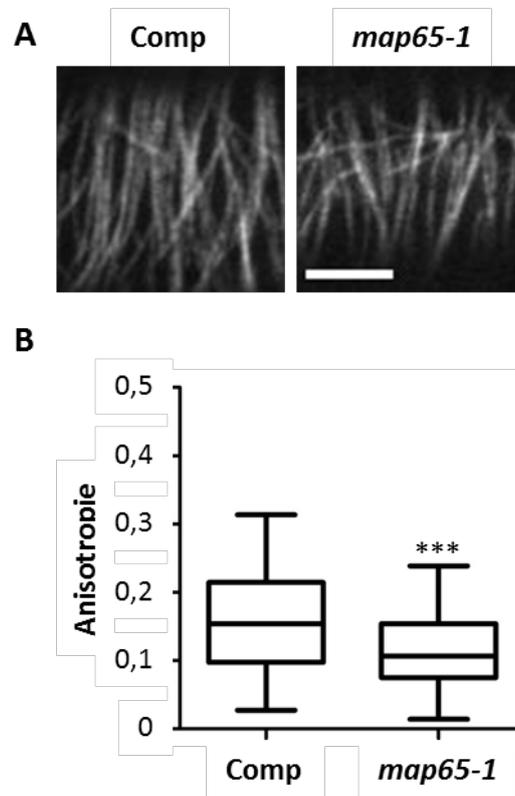


Figure 32 : Anisotropie du réseau cortical de microtubules dans les cellules en élongation du mutant *map65-1*.

Anisotropie du réseau cortical de microtubules, mesurée avec le plug-in FibrilTool (Boudaoud *et al.*, 2014) chez des plantes complémentées et *map65-1*.

(A) Organisation du réseau cortical dans des cellules épidermique d'hypocotyle étioilé chez le mutant *map65-1* et sa lignée complémentée. Barre d'échelle, 5µm.

(B) Anisotropie mesurée dans les cellules épidermique en élongation de l'hypocotyle. n=78 et 71 cellules pour le contrôle et le double mutant respectivement. Les cellules proviennent de 9 plantes pour chaque génotype.

Les différences sont significatives d'après un test de Mann-Whitney dans l'hypocotyle p=0,0002.

Pour faciliter l'analyse, en s'inspirant de Lindeboom *et al.* 2014, nous avons décidé de soustraire à chaque image celle qui l'a précède de façon à révéler la modification de longueur des microtubules (polymérisation ou dépolymérisation) indépendamment de leur taille (Figure 33 F et G). La soustraction était précédée d'une étape de traitement (soustraction de l'écart-type du signal puis différence de gaussiennes) de l'image permettant d'améliorer le rapport signal sur bruit. Cette méthode, automatisée par un script ImageJ, facilite la lecture des kymographes (Figure 33 J) (Annexe 4).

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 34. Bien qu'il y ait, entre la lignée contrôle et la lignée *eb1a-2 eb1b-3* quelques variations entre les vitesses de polymérisation et de dépolymérisation (Figure 34 A) ainsi qu'entre les fréquences de catastrophes et de sauvetages (Figure 34 B), ces différences ne sont pas statistiquement significatives. En revanche, la fréquence de catastrophe et la vitesse de dépolymérisation semblent être augmentées chez le mutant *map65-1* (Figure 34 C et D). Toutefois, une différence de dynamique aussi faible n'explique probablement pas, à elle seule la désorganisation du réseau constatée chez ce mutant.

2) Instabilité dynamique et réorganisation du réseau cortical

Comme nous l'avons rapidement présenté en fin d'introduction, le réseau cortical de microtubules dans les cellules en élongation est transverse et se réoriente, une fois l'élongation terminée, pour devenir longitudinal. Ce mécanisme de réorientation repose sur la dynamique des microtubules. Un mécanisme d'amplification, fondé sur l'activité de la katanine va permettre d'augmenter rapidement la proportion des microtubules longitudinaux. En effet, l'émergence d'un microtubule oblique va provoquer un événement de rencontre entre celui-ci et un faisceau transverse. La katanine est recrutée au niveau de ce croisement pour couper le microtubule nouvellement formé. Les extrémités (+) et (-) ainsi formées sont stabilisées. La nouvelle extrémité (+) va subir un événement de sauvetage et la polymérisation de ce microtubule va reprendre, bien souvent avec une légère inclinaison vers l'axe longitudinal. Ainsi, d'événements de croisements en événement de croisements, ce mécanisme permet de faire émerger un réseau longitudinal rapidement (Lindeboom *et al.*, 2013). Le réseau transverse disparaît progressivement du fait de la dynamique des microtubules qui le composent. La réorientation du réseau cortical est une réponse physiologique qui peut être provoquée expérimentalement par l'exposition de plantules

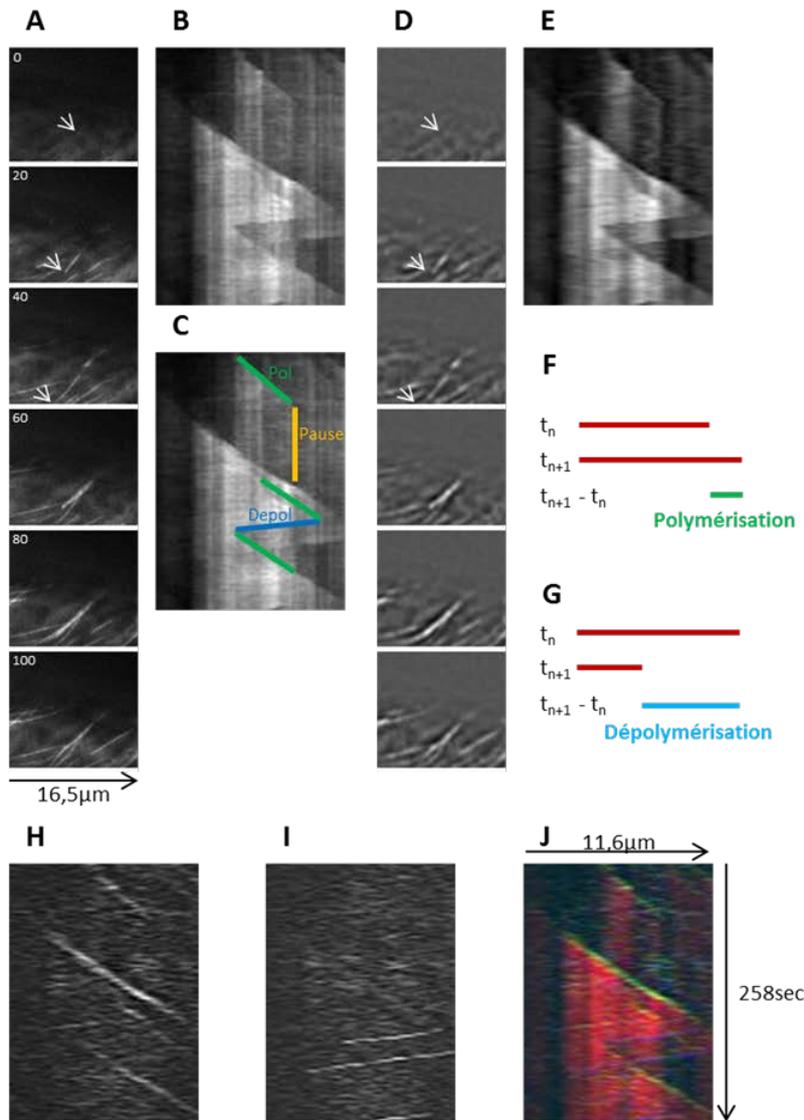


Figure 33 : Principe de la soustraction d'image consécutive pour améliorer la lecture des kymographes.

(A) Polymérisation d'un microtubule (flèche blanche) pendant les 100 secondes après le photo-blanchiment.

(B) Kymographe de la trajectoire suivie par le microtubule indiqué par la flèche blanche en (A).

(C) Certains évènements de polymérisation (vert), de pause (jaune) et de dépolymérisation (bleu) sont indiqués sur le kymographe.

La transition d'une ligne verte à une ligne bleue est une catastrophe. L'évènement inverse est un sauvetage.

(D et E) Le même microtubule qu'en (A) et (B) à été suivi après traitement du film.

(F et G) La soustraction des images consécutives ($t_{n+1} - t_n$) permet de révéler les évènements de polymérisation (en vert) et de dépolymérisation (en bleu).

(H et I) Les soustractions décrites en (G) et (F) permettent de mettre en évidence les polymérisations et les dépolymérisations.

(J) La superposition des images (E) en rouge, (H) en vert et (I) en bleu permet de faciliter la lecture du kymographe (E).

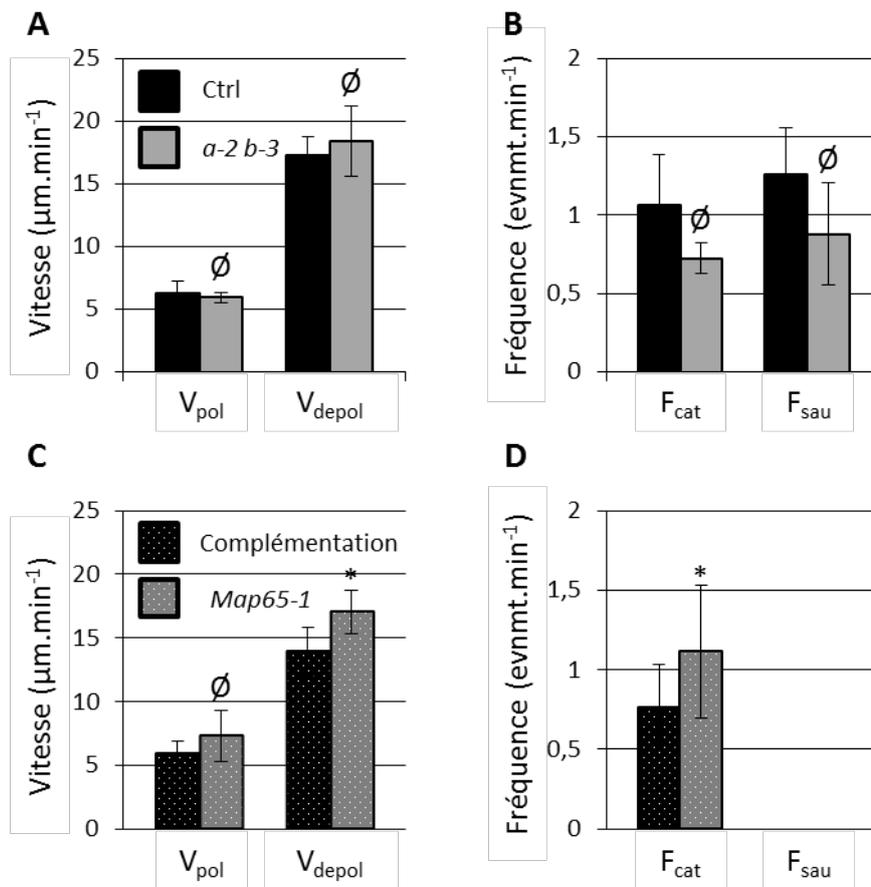


Figure 34 : Dynamique des microtubules chez les mutants *eb1a-2 eb1b-3* et *map65-1*.

Paramètres de l'instabilité dynamique mesurés dans l'épiderme d'hypocotyle étioilé.

(A) Vitesses de polymérisation et de dépolymérisation des extrémités (+) de microtubules de plantes contrôle (35S::GFP:TuA6) ou double mutant *eb1a-2 eb1b-3*.

(B) Fréquence de transitions des extrémités (+) de microtubules de plantes contrôle (35S::GFP:TuA6) ou double mutant *eb1a-2 eb1b-3*.

(C) Vitesses de polymérisation et de dépolymérisation des extrémités (+) de microtubules de plantes complémentées ou *map65-1*. L'astérisque indique une différence significative d'après un test de Mann-Whitney.

(D) Fréquence de transitions des extrémités (+) de microtubules de plantes complémentées ou *map65-1*. L'astérisque indique une différence significative d'après un test de Mann-Whitney. Les données proviennent de 8 cellules, de 8 plantes et de 3 répétitions biologiques par chacun des génotypes

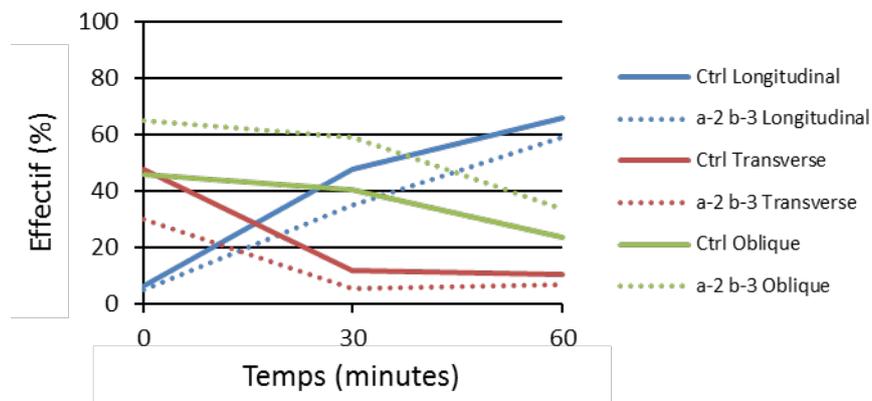


Figure 35 : Réorientation du réseau cortical de microtubule après un traitement à l’auxine chez le mutant *eb1a-2 eb1b-3*.

Pourcentage de cellules de la partie supérieure de l’hypocotyle présentant un réseau de microtubule longitudinal (bleu), transverse (rouge), ou oblique (vert) au cours du temps lors d’un traitement à l’auxine. Les plantes contrôle (ligne pleine) et double mutante (ligne pointillée) présente la même dynamique de réorientation.

Les données proviennent de 10 plantules. Au moins 59 cellules analysées par points de temps. 2 répétitions biologiques.

étiolées à la lumière bleue ou à une dose massive d'auxine extrinsèque. Ce mécanisme devient alors un moyen d'évaluer la dynamique des microtubules.

La proportion de cellules présentant un réseau de microtubule transverse, longitudinal ou oblique a été mesurée dans la partie apicale d'hypocotyle de plantules étiolées de 4 jours, après avoir été exposées à de l'auxine pendant 0, 30 ou 60 minutes. Dans les plantules contrôle, en une heure, la proportion de cellules ayant un réseau de microtubules transverses passe de 47 % à 10 %. Dans le même temps, la proportion de cellule ayant un réseau longitudinal passe de 6 à 66 %. Les plantes mutantes pour EB1a et EB1b se comportent exactement de la même manière ; après une heure, il y a 7% de réseaux transverses et 59 % de réseaux longitudinaux alors qu'au départ il y en avait 30 % et 5 % respectivement (Figure 35).

Le fait que les cellules soient capables de réorienter leur réseau de microtubules suite à un traitement à l'auxine suggère fortement que la dynamique des microtubules n'est pas perturbée en absence de EB1a et EB1b et que ces protéines ne semblent pas impliquées dans la voie de signalisation de l'auxine.

III) EB1 et hypersensibilité de la racine au toucher

Lors de leur croissance verticale sur un milieu gélosé, les plantules mutantes pour EB1 présentent une déviation de la racine vers la droite. Ce phénotype observé chez les mutants de EB1 obtenus dans l'écotype Wassilewskija (WS) par Bisgrove *et al.* n'a pas été rapporté chez les mutants obtenus en écotype Columbia-0 (Col-0) par Komaki *et al.* (Bisgrove *et al.*, 2008, Komaki *et al.*, 2010). Pourtant, lorsque nous avons cultivés ces mutants verticalement sur un milieu ½ MS contenant 3 g.L⁻¹ d'agar, certains présentent une déviation de la racine comparable à ce qui a été publié par Bisgrove *et al.* et Gleeson *et al.* (Bisgrove *et al.*, 2008, Gleeson *et al.*, 2012) (Figure 36 A). Le simple mutant *eb1a-2* est le seul dont la racine ne présente pas de déviation. En sus d'être déviée, la racine du double mutant *eb1a-2 eb1b-3*, exprimant ou non la tubuline-GFP, est également plus courte que celle de plantes sauvages ou contrôles (Figure 36 B).

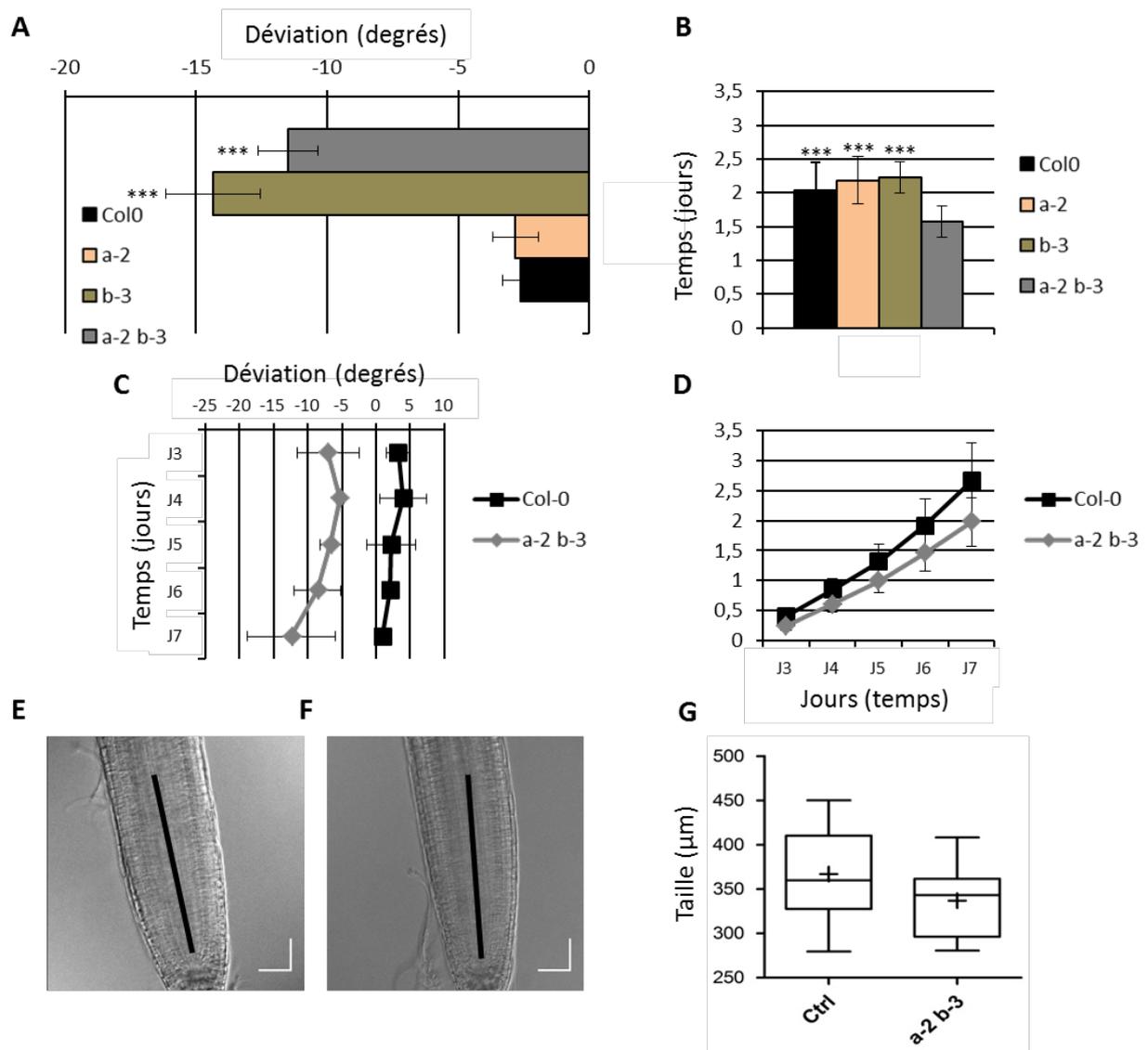


Figure 36 : Déviation de la racine des simples et double mutant de EB1a et EB1b dans le fond génétique Col-0.

(A) Déviation de la racine chez les simples mutants et le double mutant en fond génétique sauvage après 7 jours de croissance.

(B) Taille de la racine chez les simples mutants et le double mutant en fond génétique sauvage après 7 jours de croissance.

(C) Cinétique de la déviation de la racine pendant 5 jours chez le double mutant *eb1a-2 eb1b-3* n'exprimant pas la tubuline-GFP.

(D) Cinétique de la croissance racinaire pendant 5 jours chez le double mutant n'exprimant pas la tubuline-GFP.

(E et F) Aspect du méristème apical racinaire chez des plantes sauvage (Col-0) et le double mutant *eb1a-2 eb1b-3* après 7 jours de croissance.

(G) Taille du méristème apical racinaire chez des plantes sauvage (Col-0) et le double mutant *eb1a-2 eb1b-3* après 7 jours de croissance. Les différences ne sont pas significatives d'après un test de Mann-Whitney.

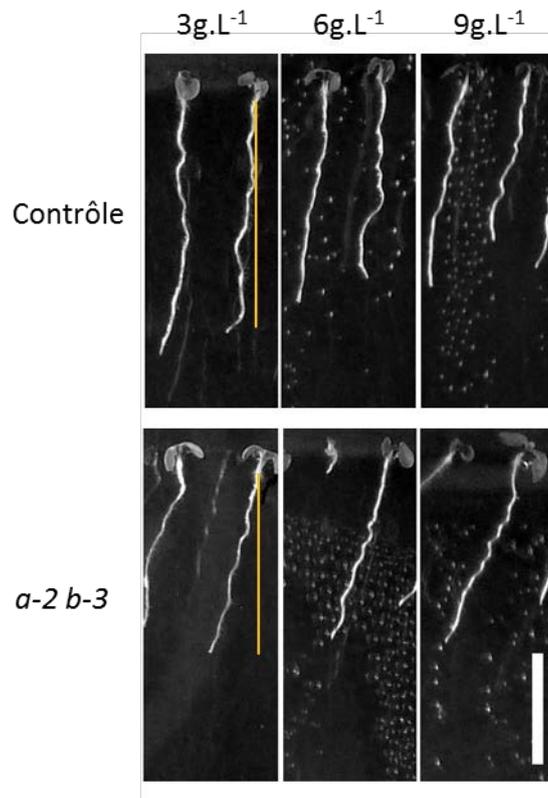


Figure 37 : Hypersensibilité de la racine du double mutant au toucher induit par le contact avec le milieu.

La racine du double mutant *eb1a-2 eb1b-3* est déviée vers la gauche (vue côté plantule) après 7 jours de croissance sur un milieu contenant 3, 6 ou 9 grammes d'agar par litre. La déviation de la racine est proportionnelle à la concentration en agar dans le milieu alors que la racine des plantes contrôles (*35S::GFP:TuA6*) est globalement verticale indépendamment de la concentration en agar.

Barre d'échelle 1 cm.

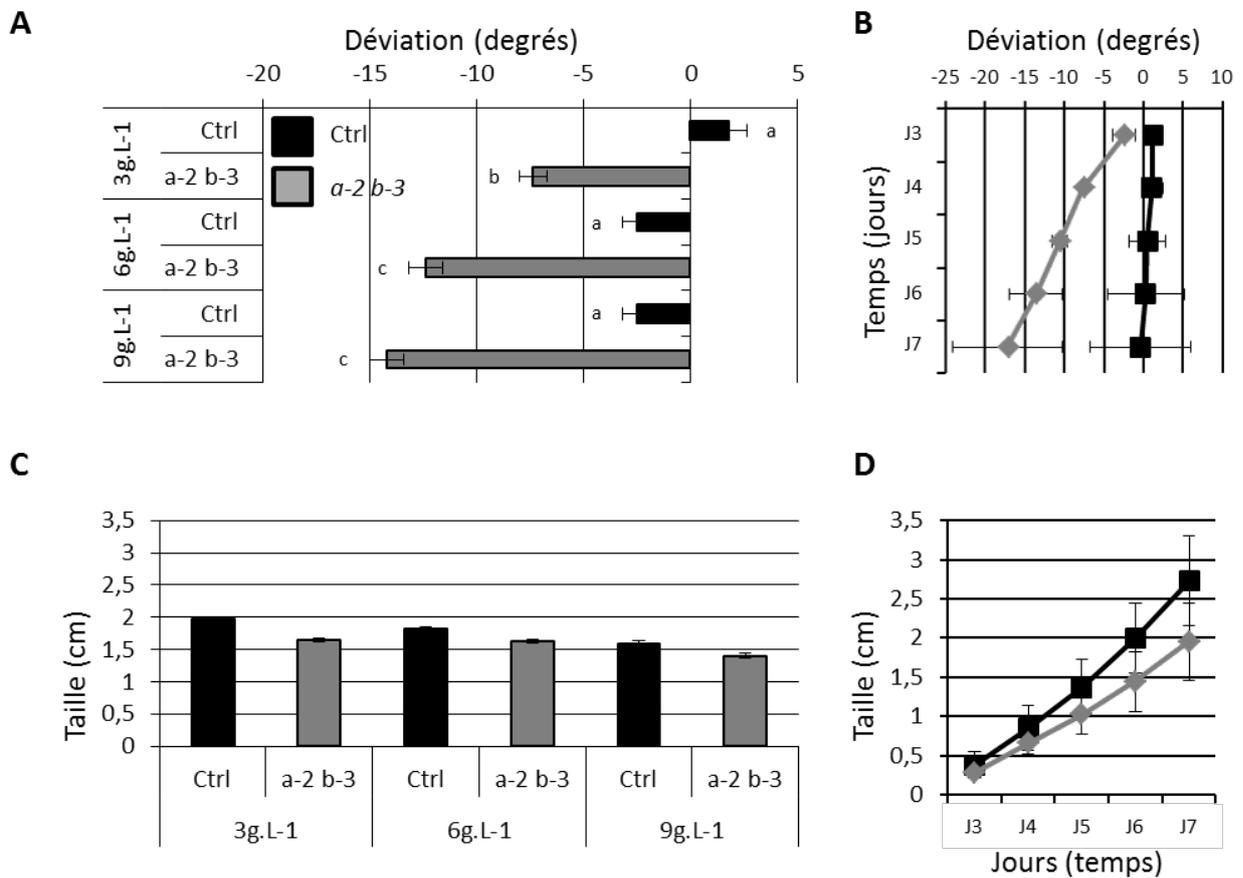


Figure 38 : Hypersensibilité du double mutant *ebla-2 eblb-3* au toucher induit par le milieu vertical.

(A) Déviation de la racine par rapport à la verticale chez les plantes contrôle

(35S ::GFP :TuA6) et *ebla-2 eblb-3* en fonction de la concentration en agar dans le milieu.

(B) Cinétique de la déviation de la racine pendant 5 jours chez les plantes contrôle

(35S ::GFP :TuA6) et *ebla-2 eblb-3* sur un milieu à 3g.L⁻¹ d'agar.

(C) Longueur de la racine par rapport à la verticale chez les plantes contrôle

(35S ::GFP :TuA6) et *ebla-2 eblb-3* en fonction de la concentration en agar dans le milieu.

(D) Cinétique de la croissance racinaire pendant 5 jours chez les plantes contrôle

(35S ::GFP :TuA6) et *ebla-2 eblb-3* sur un milieu à 3g.L⁻¹ d'agar.

Les lettres (A) indiquent des différences significatives d'après un test de Kruskal-Wallis. Les données proviennent de 3 répétitions biologiques et d'au moins 76 plantes par génotype.

La déviation des racines est proportionnelle à la concentration en agar présente dans le milieu (Figure 16). Les plantes contrôles présentent une déviation moyenne de $1,8^\circ \pm 8$ sur un milieu contenant 3 g.L^{-1} d'agar, de $-2,48^\circ \pm 6,8$ sur un milieu contenant 6 g.L^{-1} et de $-2,48^\circ \pm 7,2$ sur un milieu contenant 9 g.L^{-1} . Le double mutant présente des racines déviées de $-7,3^\circ \pm 5,9$, $-12,4^\circ \pm 7,8$ et $-14,2^\circ \pm 7,7$ sur un milieu contenant respectivement 3 g.L^{-1} , 6 g.L^{-1} et 9 g.L^{-1} (Figure 37 et Figure 38 A). Contrairement à la déviation de la racine, le phénotype concernant la taille de la racine n'est pas aggravé par la concentration en agar (Figure 38 C). Il semble donc que la déviation de la racine soit liée à la dureté du milieu. Le double mutant semble donc hypersensible au toucher induit par le frottement sur le milieu de culture vertical. Plusieurs mécanismes pouvant expliquer cette hypersensibilité au toucher seront abordés en discussion.

Le raccourcissement de la racine ne semble pas causé par un défaut de division cellulaire puisque la taille du méristème apical racinaire n'est pas modifiée (Figure 36 E, F et G). En revanche, l'élongation cellulaire pourrait être affectée chez le double mutant vu ses cinétiques de croissance racinaire (Figure 36 D et Figure 38 D).

IV) Mise en évidence des propriétés intrinsèques de EB1.

Chez les animaux et les levures, la protéine EB1 est connue pour sa capacité à recruter un nombre important de partenaires à l'extrémité (+) des microtubules. Les phénotypes observés chez le double mutant *eb1a-2 eb1b-3* peuvent donc être dus aux fonctions intrinsèques des protéines EB1a et EB1b sur l'organisation du réseau de microtubules et la formation de faisceaux, ou à l'absence de certains de leurs partenaires à l'extrémité (+) des microtubules. L'utilisation d'un système acellulaire reconstitué à partir de protéines purifiées permet d'analyser les propriétés intrinsèques des protéines et ainsi de déterminer la contribution des protéines EB1 aux phénotypes constatés *in vivo* chez le double mutant. En collaboration avec l'équipe de Isabelle Arnal (GIN, Grenoble), nous avons utilisé un système acellulaire pour observer le comportement de microtubules polymérisés, à partir de tubuline purifiée de cerveau de veaux, en présence de EB1b ou de EB1 murin.

La protéine EB1b fusionnée à une étiquette histidine a été produite chez *E. coli*. Les conditions d'expression ont été mise au point de façon à obtenir la plus grande quantité de

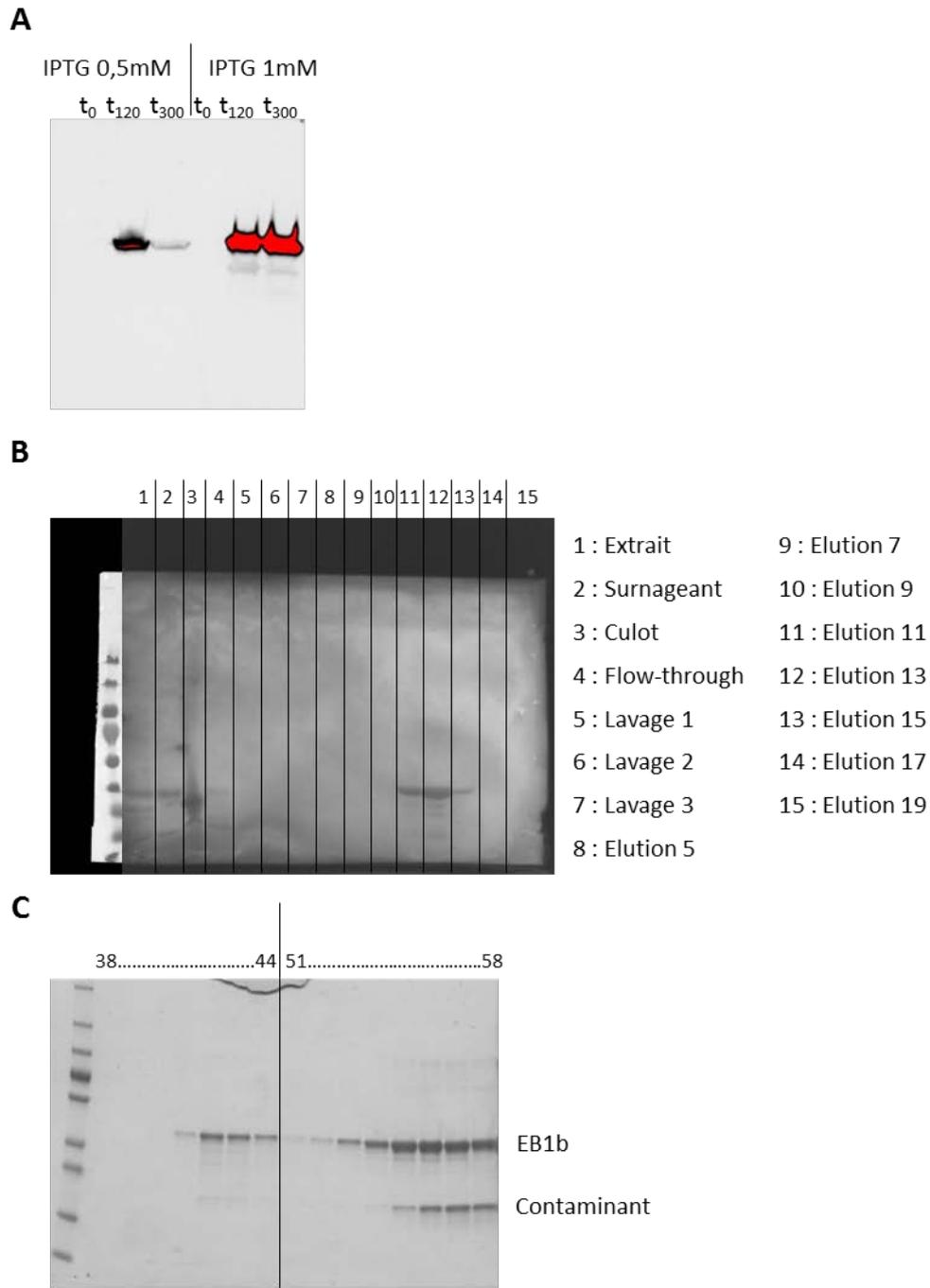


Figure 39 : Expression de la protéine EB1 b chez *E.coli*.

(A) Test d'expression de la protéine EB1 b en fonction de la concentration en IPTG et du temps d'induction (en minutes). Extraits bruts analysés par Western blot. Anticorps primaire anti tag 6xHis.

(B) Western blot sur les différentes étapes de la purification de la protéine sur colonne Cobalt. La protéine est extraite dans les fractions 11 à 13.

(C) SDS PAGE de protéine après la chromatographie d'exclusion. La protéine apparait dans les fractions 41 à 44 puis dans les fractions 51 à 58. La présence d'un contaminant dans ces dernières fractions 51 à 58 ne nous permet pas de les utiliser dans nos expériences.

protéine possible (Figure 39 A). La purification sur colonne cobalt (voir matériel et méthode) a permis d'obtenir une protéine relativement pure et peu dégradée (Figure 39 B). La dernière étape de purification en chromatographie d'exclusion a permis d'améliorer encore la pureté de la protéine. Pour limiter la présence d'un contaminant nous avons travaillé avec les fractions 42, 43 et 44 (Figure 39 C) qui étaient celles contenant le plus de EB1b par rapport au contaminant.

1) Effet sur la dynamique des microtubules

Les premières expériences ont consisté à comparer la dynamique de microtubules polymérisés à partir de 15 μM de tubuline en présence de 75 nM de EB1 b ou 75 nM de EB1 de souris. La dynamique des microtubules a été mesurée à l'aide de kymographes (Figure 40) et les résultats sont présentés en figure 41. Les expériences confirment l'effet bien documenté de EB1 murin sur la dynamique des microtubules et la vitesse de polymérisation. Comparé à EB1 de souris, EB1b semble avoir un effet assez limité sur la fréquence de catastrophes (+143% contre +1,5%). En revanche, EB1 a à un effet non négligeable sur les vitesses de polymérisation et de dépolymérisation. En effet, alors que EB1 de souris augmente la vitesse de polymérisation (+43%), EB1 b semble la réduire (-23%). EB1 b réduit également la vitesse de dépolymérisation (-7%) (Figure 41).

2) Effet sur la formation des faisceaux

Pour examiner l'effet de Eb1b sur la formation de faisceaux de microtubules nous avons comparé son effet à celui de MAP65-1, une protéine connue pour sa capacité à en former (Portran *et al.* 2013). MAP65-1 et EB1 sont prédites comme pouvant interagir sur différentes bases de données comme le « Arabidopsis Network Analysis Pipeline » (Annexe 5). Nous avons donc également analysé l'effet de la présence de ces deux protéines sur la formation de faisceaux pour tester un éventuel effet synergique.

Suivre la formation de faisceaux de microtubules nécessite d'observer le comportement des microtubules à chaque évènement de rencontre (Figure 42 A). Nous avons mesuré, à la fois le devenir des microtubules après la rencontre mais également l'angle de rencontre et la polarité des microtubules lors du croisement. Ces expériences *in vitro* étant extrêmement préliminaires, nous n'avons pas suffisamment de répétitions de l'expérience pour en tirer une conclusion consistante ou valable. Cependant, bien que préliminaire, il semble qu'il y ait une

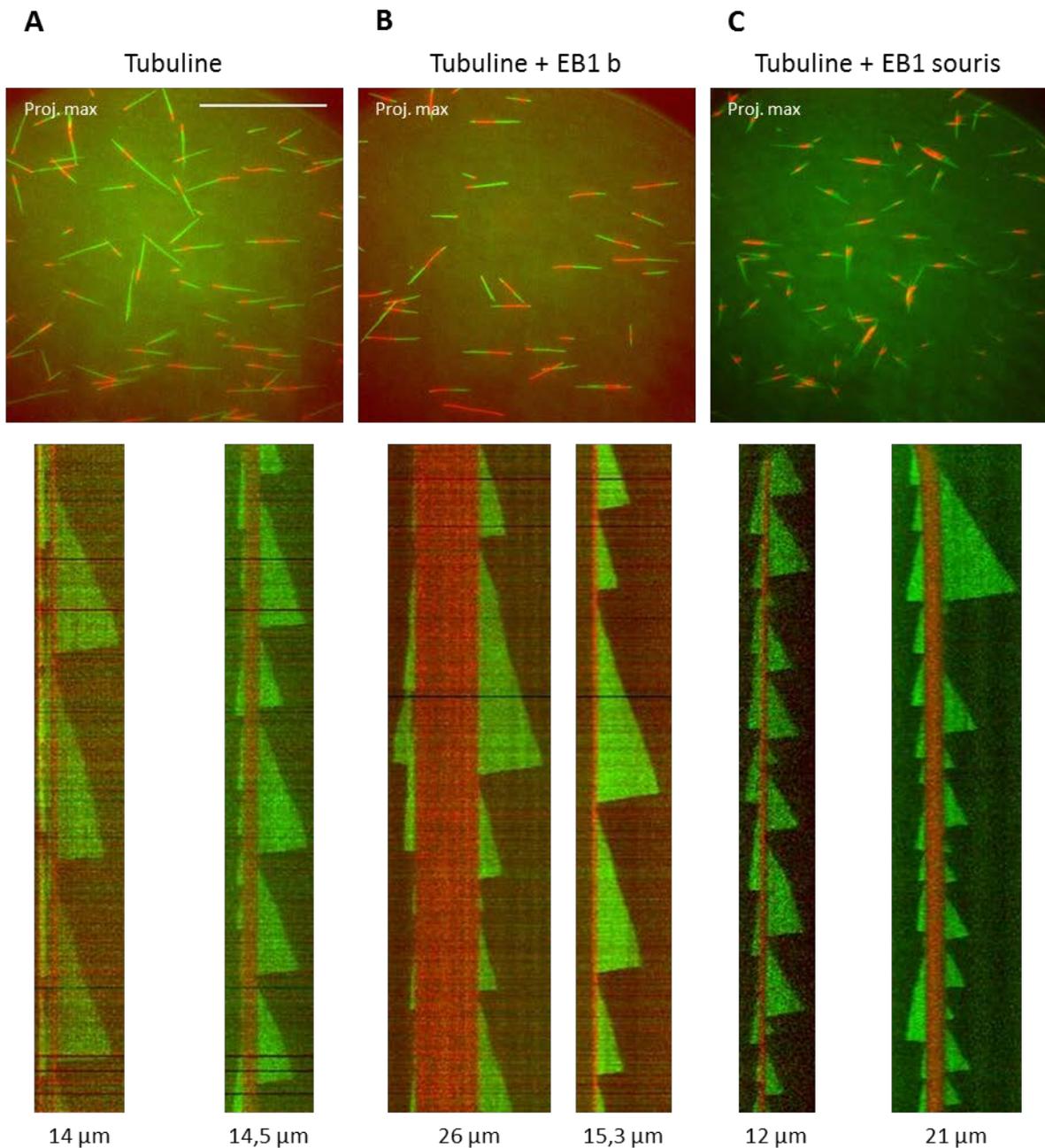


Figure 40 : Polymérisation de microtubules *in vitro* en présence de EB1b ou EB1 murin. Effet de 75 nM de EB1 b (B) et 75 nM de EB1 murin (C) sur des microtubules polymérisés *in vitro* en présence de 15µM de tubuline (A) et observés pendant 34 minutes à 32°C en TIRF. En rouge les amorces stabilisées au GMPCPP, en vert les microtubule polymérisés à partir de la tubuline libre.

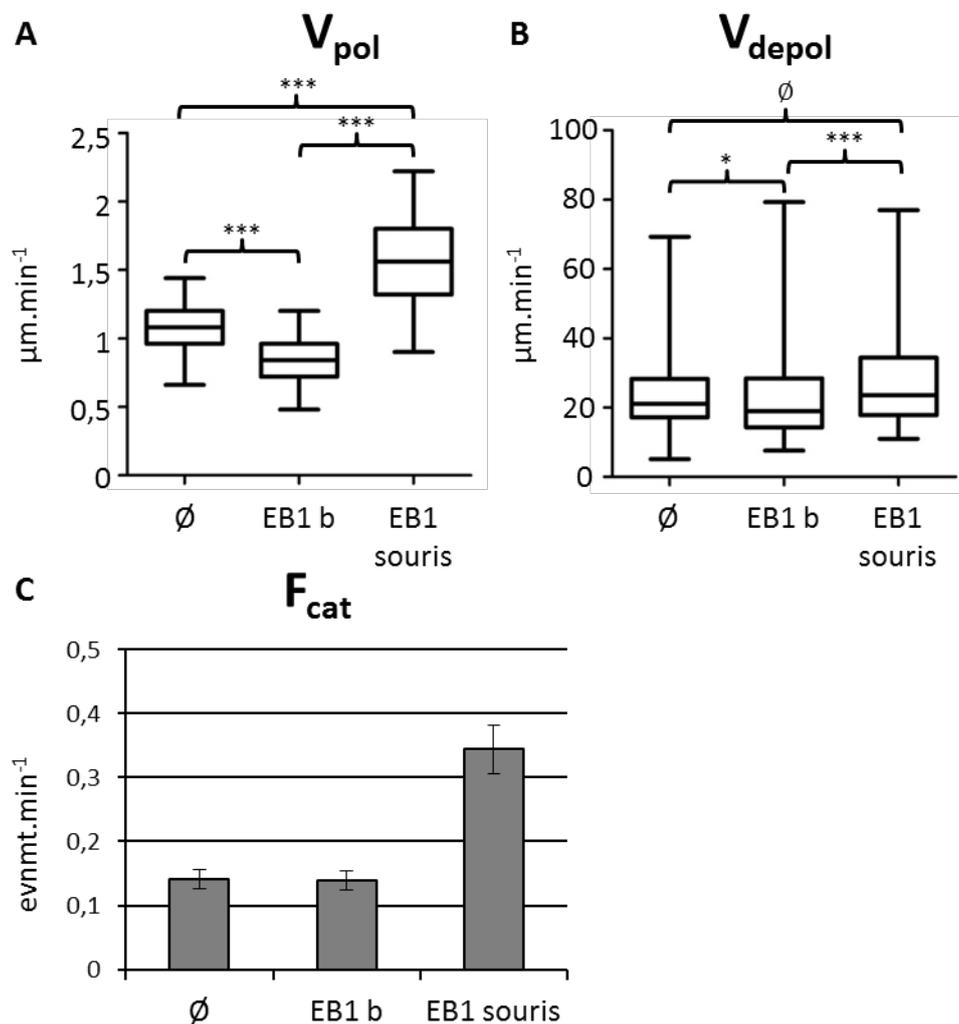


Figure 41 : Paramètres de l'instabilité dynamique des microtubules mesurés *in vitro* en présence de EB1 b et de EB1 mouse.

Effet de 75 nM de EB1b et 75 nM de EB1 murin sur des microtubules polymérisés *in vitro* à partir de 15 μM de tubuline.

(A) Vitesse de polymérisation des extrémités (+). Les astérisques indiquent les différences significatives d'après un test de Kruskal-Wallis.

(B) Vitesse de dépolymérisation des extrémités (+). Les astérisques indiquent les différences significatives d'après un test de Kruskal-Wallis.

(C) Fréquence de catastrophe des extrémités (+).

Les données proviennent de l'analyse de 2, 3 et 3 films ayant permis l'observation de 40, 55, 28 microtubules pour la tubuline seule, la tubuline + EB1 b et la tubuline + EB1 murin respectivement.

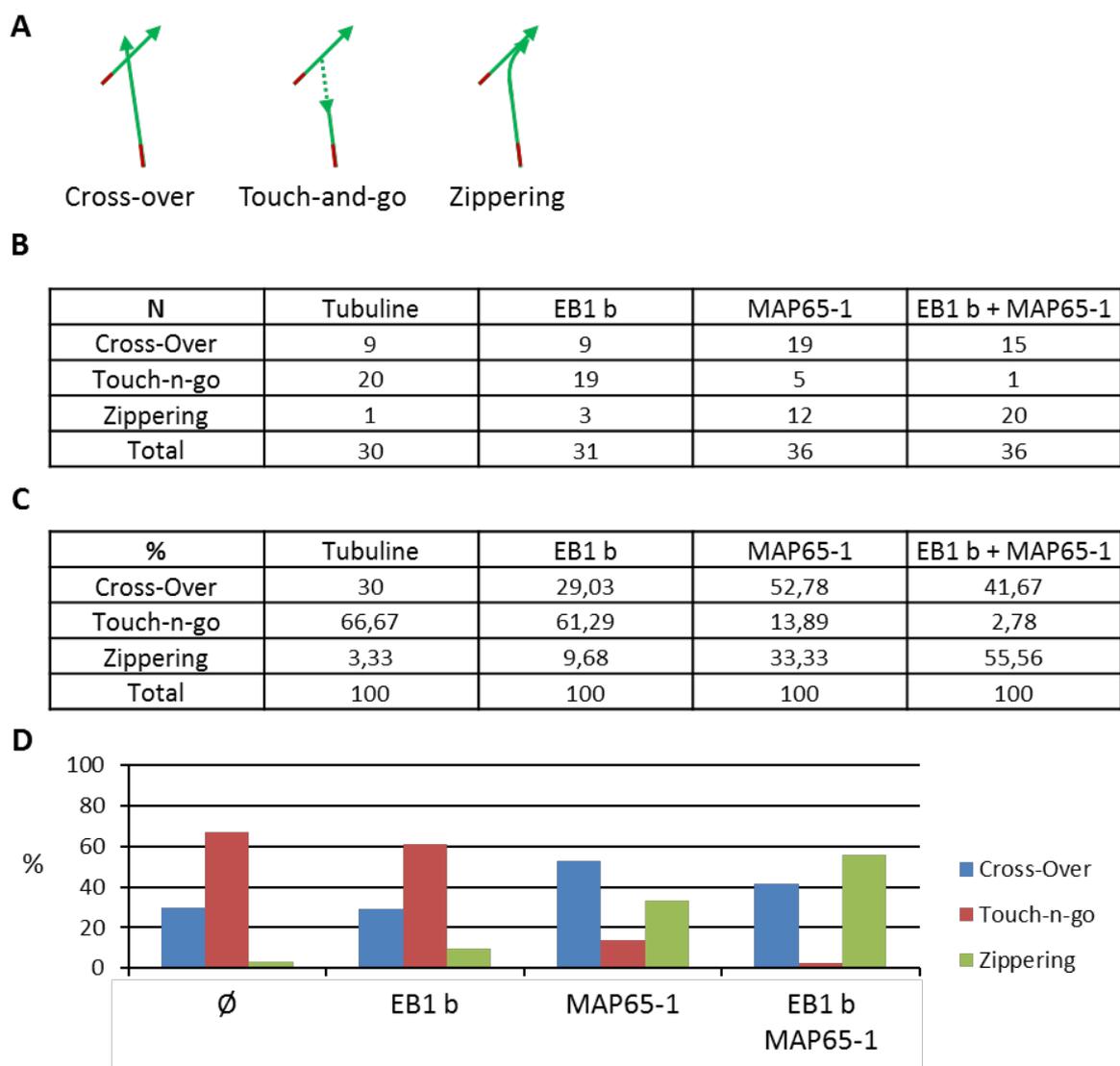


Figure 42 : Résultats préliminaire de l'effet de EB1 b sur la formation des faisceaux de microtubules *in vitro*.

Effet de 75 nM de EB1b, de 75 nM de MAP65-1 et de 75nM de EB1 b et de MAP65-1 sur des microtubules polymérisés *in vitro* en présence de 20 μ M de tubuline.

(A) Comportement possible des microtubules lors d'un évènement de croisement. Un cross-over correspond au croisement des deux microtubules. Un touch-and-go correspond à l'apparition d'une catastrophe au moment du contact. Un évènement de zippering correspond à la formation d'un faisceau lors du croisement.

(B) Nombre d'évènements analysés dans les différentes conditions.

(C) Pourcentage représentés par les différents type d'évènements lors des croisements de deux microtubules.

(D) Histogramme des données du tableau (C).

Les données proviennent de l'analyse d'un seul film dans chacune des conditions.

légère réduction des « touch-and-go » en présence de EB1 et MAP65-1 (Figure 42 D). De plus, nos résultats permettent de confirmer l'effet positif de MAP65-1 sur la formation de faisceaux de microtubules (Figure 42 D). Cet effet positif est tellement fort qu'il sera probablement nécessaire de réduire la dose de MAP65-1 dans la condition où les deux protéines sont présentes. En effet, si l'on cherche à voir une augmentation de la formation des faisceaux en présence de MAP65-1 et de Eb1b, comparée à une condition où MAP65-1 est seule, il ne faut pas être à saturation de l'effet de MAP65-1.

V) Exploration du rôle de EB1 dans l'organisation du réseau endomembranaire.

Chez les mammifères, EB1 interagit avec la protéine STIM1, qui est localisée sur la membrane du réticulum endoplasmique (Grigoriev *et al.*, 2008.). Cette interaction implique les microtubules dans la formation de tubules de réticulum. Comme nous le présentions en introduction, aucun orthologue de STIM1 n'a été identifié chez *Arabidopsis*. De plus, une étude montre que EB1b peut se localiser à la fois à l'extrémité (+) des microtubules et sur la membrane du réticulum endoplasmique (Mathur *et al.*, 2003). Cette double localisation suggère un rôle de EB1 dans la morphodynamique du réticulum endoplasmique en associant transitoirement sa membrane à l'extrémité (+) de microtubules très dynamiques.

Nous avons utilisé l'expression transitoire de la protéine HDEL fusionnée à la protéine fluorescente mCherry dans les cotylédons de plantes exprimant de façon stable la protéine EB1 a fusionnée à la GFP. La visualisation du réticulum endoplasmique et de EB1a en même temps permet de tester cette hypothèse. Contrairement aux données publiées, la plupart des cellules ne montraient pas de co-localisation entre les deux marqueurs. Certaines cellules présentaient une co-localisation presque totale entre les marqueurs (Figure 43 B) alors que, dans la plupart des cellules, la co-localisation semble assez faible (Figure 43 A). De plus, dans les cellules présentant une co-localisation quasi parfaite le marquage des extrémités (+) par EB1a n'est pas visible. Ces résultats laissent à penser que, entre nos mains, la co-localisation entre EB1 et le réticulum est un artefact due à la surexpression de protéines fluorescentes. En effet, le fait que la protéine ne soit pas visible à l'extrémité (+) des microtubules indiquent que ces cellules ont probablement été stressées par les manipulations. Les marquages que l'on peut y observer ne reflètent donc certainement pas une situation physiologique « normale ».

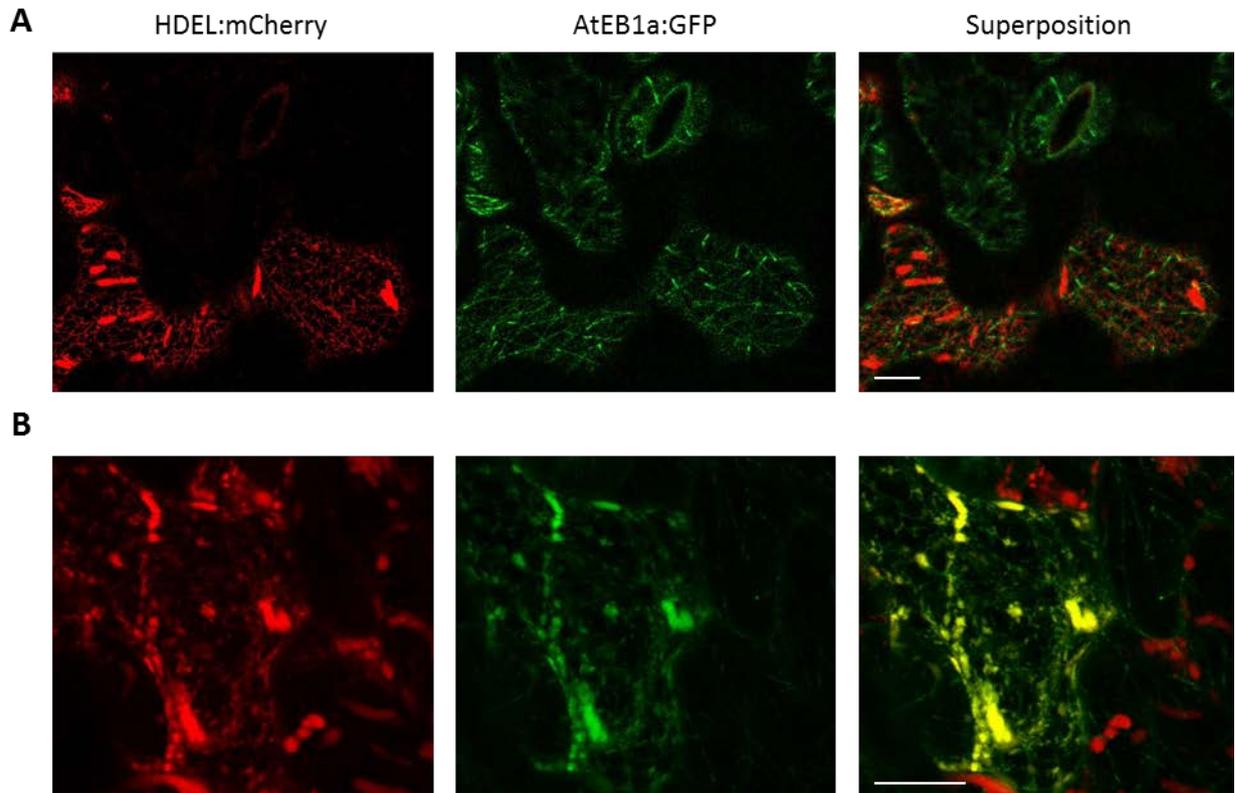


Figure 43 : Co-localisation de la protéine EB1 a avec le réticulum endoplasmique.
 Expression transitoire de la protéine HDEL:mCherry dans des cotylédons de plantes exprimant de façon stable la protéine EB1a fusionnée à la GFP. La plupart des cellules ne présentent pas de co-localisation entre EB1a et le réticulum endoplasmique (A). Toutefois certaines cellules, à l'inverse, révèle une co-localisation quasi parfaite sans que les extrémités (+) des microtubules ne soient visibles (B). Barres d'échelles : 10 μ m.

Bien que nous n'ayons pas été capable d'observer la co-localisation de EB1 a avec le réticulum endoplasmique, nous avons montré que le réseau de microtubules est désorganisé chez le double mutant *eb1a-2 eb1b-3*. Or, l'association entre microtubules et endomembranes, qu'elle implique EB1 ou non, n'est plus à prouver (Grigoriev *et al.*, 2008, Hamada *et al.*, 2014). De ce fait, on peut s'attendre à ce que chez ce mutant, l'organisation des endomembranes soit perturbée du fait de la désorganisation du réseau de microtubules. Pour explorer cette piste nous avons décidé d'utiliser la microscopie électronique en transmission. En effet, cette technique est la seule offrant une résolution suffisamment bonne pour observer la morphologie des compartiments endomembranaires. Les observations réalisées sur des cellules épidermiques d'hypocotyle étioilé n'ont pas révélées de modifications de la morphologie ou de l'organisation des compartiments endomembranaires (Figure 44). La désorganisation du réseau de microtubules ne semble donc pas suffisante pour induire des modifications de l'organisation des endomembranes suffisamment fortes pour être détectées avec cette technique dans l'hypocotyle étioilé.

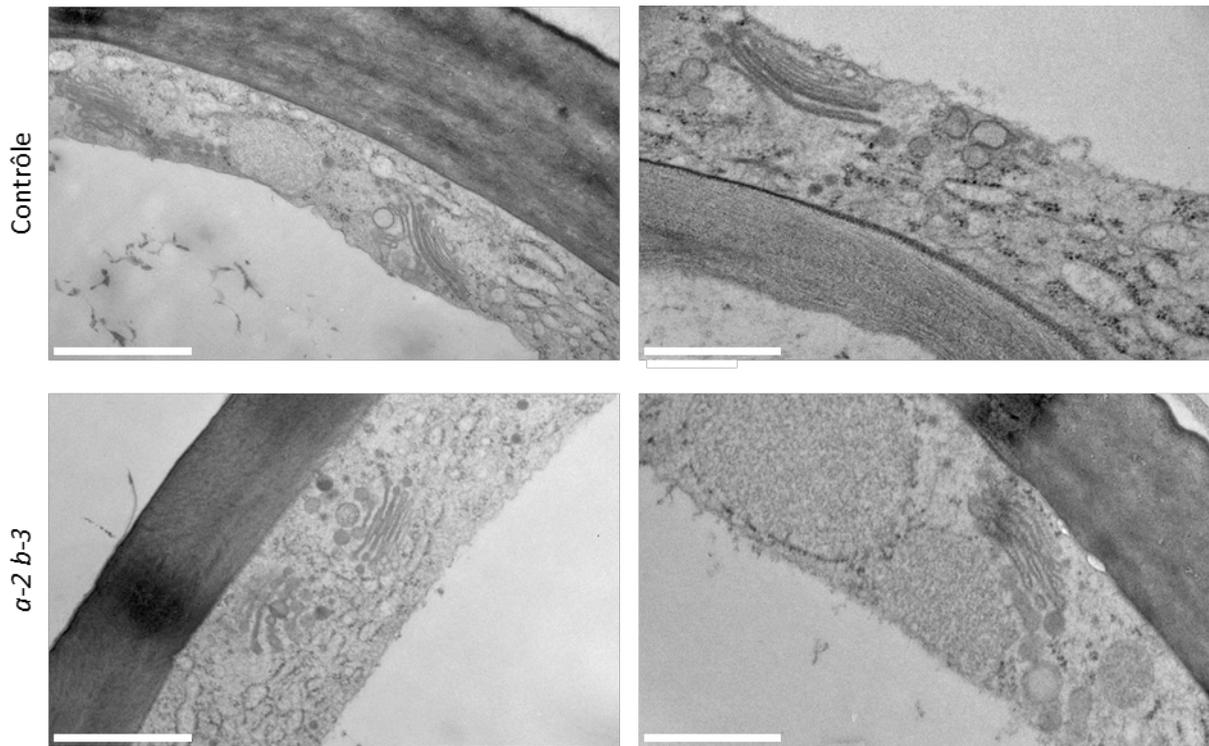


Figure 44 : Ultrastructure des compartiments endomembranaires chez le double mutant *ebl1a-2 ebl1b-3*.

L'aspect des compartiments endomembranaires chez le double mutant ne semble pas modifié en comparaison aux plantes contrôle après cryo-fixation sous haute pression et cryo-substitution.

Barre d'échelle : 1µm (colonne de gauche) et 400 nm (colonne de droite).

Discussion

1) Limites du modèle

Comme nous l'avons vu en introduction, les microtubules sont formés par la polymérisation d'hétérodimères de tubulines α et β dont les séquences sont très conservées entre les différents règnes et domaines du vivant (Introduction I). La structure moléculaire du microtubule est elle aussi bien conservée, à quelques exceptions près toutes les cellules eucaryotes présentent une surabondance de microtubules en 13-3. Il y a également une bonne conservation des mécanismes généraux régulant l'organisation et la dynamique du réseau de microtubules (Introduction II). Pour autant, il est important de noter que des différences importantes peuvent subsister d'une espèce à une autre voire même d'un tissu à un autre au sein du même organisme. Ainsi, CLASP, par exemple, est une MAP bien conservée entre les règnes et pourtant sa localisation sub-cellulaire diffère entre les animaux où elle se comporte comme une +TIP (Mimori-Kiyosue *et al.*, 2005), la levure de boulanger dans laquelle elle est associée au corps des microtubules des faisceaux, qu'elle stabilise (Bratman et Chang, 2007) et les cellules végétales dans lesquelles elle ancre les microtubules à la membrane en étant associée avec leur corps (Ambrose et Wasteneys, 2008).

*Une étude centrée sur l'épiderme de l'hypocotyle étioilé d'*Arabidopsis thaliana**

Dans cette étude, nous nous sommes principalement intéressés à l'organisation du réseau cortical de la face externe des cellules épidermiques d'hypocotyle étioilé chez *Arabidopsis thaliana*. Les résultats obtenus concernant les fonctions des protéines EB1 a et EB1 b dans ce réseau nous informent sur les capacités de ces protéines mais ne garantissent pas que ces fonctions soient conservées dans un autre tissu ou chez une autre espèce. De plus, les méthodes employées ne permettent pas de savoir si les effets observés sont dus à l'action directe de EB1 ou à celle de ses partenaires. Si la désorganisation du réseau cortical constatée chez les mutants de EB1 est due, non pas à l'absence de la protéine elle-même à l'extrémité (+) des microtubules, mais à l'absence d'un partenaire qu'elle y recrute ou à la présence d'une autre protéine qui n'y est normalement pas recrutée, alors l'observation de résultats similaires dans d'autres tissus ou espèces est dépendante de la présence de ces potentiels intervenants dans ces tissus ou espèces.

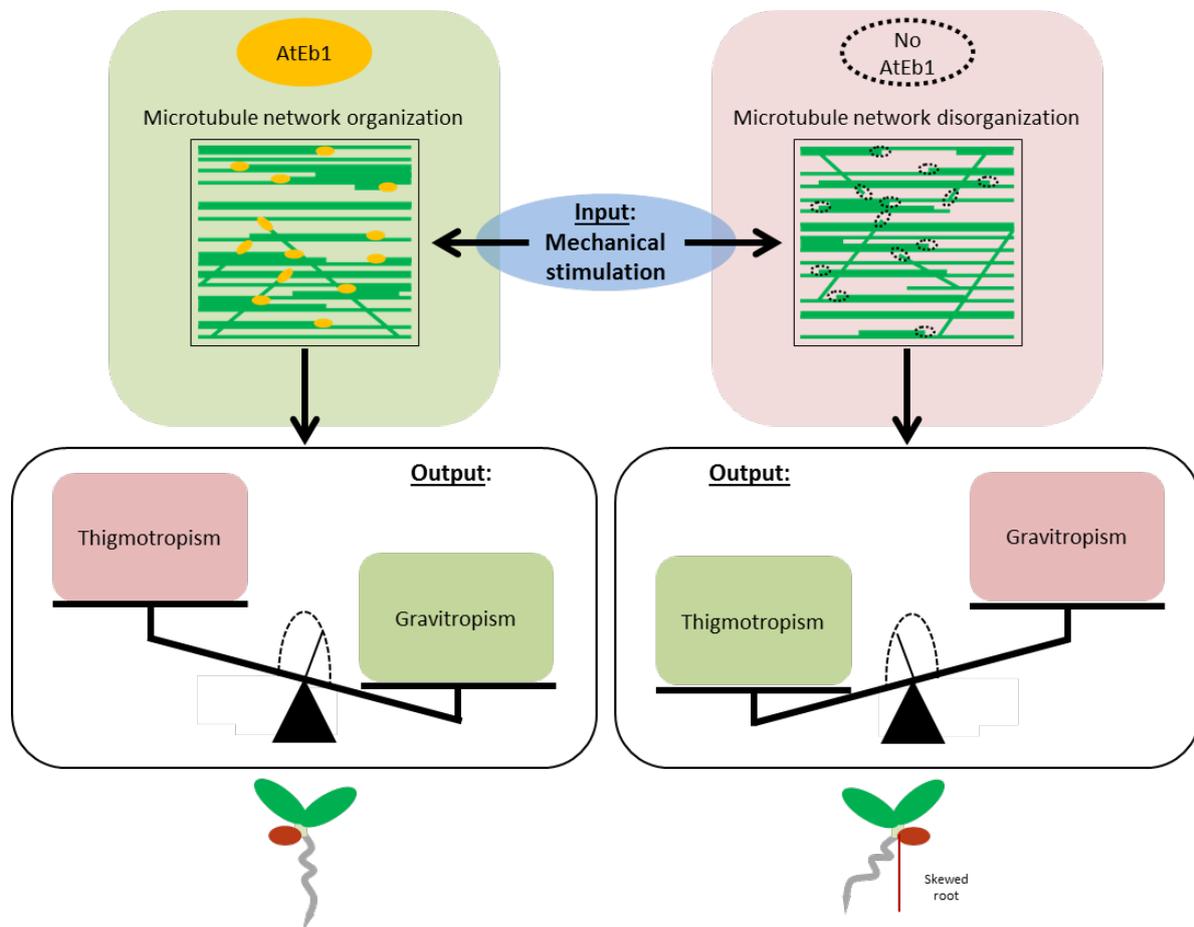


Figure 45 : EB1a et EB1b contribuent à la balance entre thigmotropisme et gravitropisme via leur rôle dans l'organisation du réseau cortical de microtubules. .
 La réponse de la racine du mutant *eb1a-2 eb1b-3* à une stimulation mécanique est disproportionnée. Une stimulation mécanique de faible intensité (la rencontre avec le milieu) provoque un mécanisme d'évitement alors que ce n'est pas le cas chez les plantes sauvages. La combinaison de cette hypersensibilité au toucher à la croissance hélicoïdale de la racine explique la déviation racinaire constatée à l'échelle macroscopique.

Utilisation de lignées reportrices, intérêts et conséquences.

L'observation du réseau de microtubules est un prérequis à la compréhension des mécanismes qui régulent sa dynamique et son organisation. Toutefois, les méthodes utilisées pour permettre l'observation du réseau microtubulaire ne sont pas exemptes d'artefacts. En effet, les méthodes d'immonocytochimie, outre qu'elles ne permettent pas d'observations dynamiques, nécessitent au moins une étape de fixation qui peut (1) altérer l'organisation du réseau et (2) modifier la population de MAP associée aux microtubules. De plus, ces démarches impliquent de pouvoir fixer l'échantillon à observer et de pouvoir y faire pénétrer les anticorps sans modifier la structure de l'échantillon en question. Pour toutes ces raisons, mais également par ce que ces techniques sont difficiles à mettre en œuvre sur les plantules entières, notamment sur l'hypocotyle étioilé, nous avons décidé d'utiliser des plantes exprimant de façon stable une chimère de la tubuline $\alpha 6$ fusionnée à la GFP. Ce procédé n'est pas non plus sans risque d'artefact. En effet, la construction utilisée (35S::TuA6:GFP, Ueda *et al.*, 1999) repose sur l'utilisation d'un promoteur ubiquitaire fort provenant du virus de la mosaïque du chou-fleur (Franck *et al.*, 1980, Boyer et Haenni, 1994). Ce système impose l'expression de la fusion traductionnelle reportrice dans presque toutes les cellules et tissus de l'organisme ce qui peut poser problème sachant que toutes les isoformes de la tubuline ne sont pas exprimées de la même façon (Kopczak *et al.*, 1992, Snustad *et al.*, 1992). De plus, l'expression de ce promoteur fort peut modifier la concentration cytosolique en tubuline ce qui va avoir un effet sur l'organisation et la dynamique des microtubules observés (Weinstein et Solomon, 1990). Enfin, la fusion traductionnelle de la tubuline à la GFP peut modifier sa structure et donc son comportement. Une alternative repose sur la fusion d'une protéine fluorescente non pas à une tubuline mais à une MAP. C'est la stratégie utilisée dans la lignée MBD (Microtubule Binding Domain) (35S::GFP:MBD-MAP4). Dans cette lignée, la GFP est fusionnée au domaine de liaison au microtubule de la protéine MAP4 de souris (Olson *et al.*, 1995, Marc *et al.*, 1998). Ici le risque vient à la fois du niveau d'expression et de l'utilisation d'une portion de MAP. Les MAP sont connues pour leurs effets sur la dynamique et l'organisation du réseau de microtubules. L'expression d'une portion de MAP risque donc, si cette portion est dotée d'une activité résiduelle, d'avoir un effet sur la dynamique ou sur l'organisation du réseau de microtubules. Le risque étant d'autant plus grand que le niveau d'expression est fort. La présence d'une MAP en grande quantité peut également déstructurer la population de MAP associé avec le microtubule en saturant les sites de liaisons potentiels.

Bien que l'utilisation de telles lignées fasse peser un risque sur les résultats obtenus, elles demeurent notre seul moyen d'étudier le réseau de microtubules de façon dynamique. L'outil n'est donc pas parfait, mais il est le moins mauvais à notre disposition. Il faut donc garder à l'esprit qu'il y a peu de chance que la dynamique des microtubules mesurée corresponde à celle qui existe dans un organisme n'exprimant pas ces constructions. Toutefois, même sans avoir accès à la dynamique des microtubules dans un système non perturbé ces outils nous permettent d'étudier l'effet d'autres mutations par comparaison. La comparaison de ces deux lignées, la lignée TuA6 et la lignée MBD, a permis d'évaluer à quel point la dynamique des microtubules y est perturbée. Les mesures rapportées par Komis *et al.* 2014 ne mettent pas en évidence de différence drastique de dynamique des microtubules entre les lignées GFP-MBD et TuA6-GFP. Dixit et Cyr 2014 ont observés le devenir des microtubules lors d'évènements de croisements dans ces deux lignées. Eux non plus n'ont pas constatés de différences flagrantes de comportement. Il semble donc que les précautions qui ont été prises lors du développement de ces lignées, à savoir, un niveau d'expression le plus faible possible et une absence de phénotype évident, aient permis de limiter les biais.

2) Mécanismes d'organisation du réseau de microtubules

EB1 et dynamique des microtubules

Comme nous le présentions en partie II de l'introduction, bien que la dynamique des microtubules soit une propriété intrinsèque de la tubuline elle est régulée *in vivo* par un grand nombre de protéines associées aux microtubules. Toutes ces protéines ne sont pas associées aux microtubules de façon autonome, certaines y sont recrutées par un intermédiaire. EB1 est probablement l'une des protéines les plus importantes dans ce réseau de protéines associées aux microtubules car elle possède une grande quantité d'interactants qu'elle peut recruter à l'extrémité (+) des microtubules (Akhmanova et Steinmetz, 2008).

En sus du nombre important de protéines recrutées par EB1 et ayant un effet sur la dynamique des microtubules, EB1 elle-même influence le comportement de l'extrémité (+). En effet, EB1 semble stimuler les fréquences de transitions chez *Saccharomyces cerevisiae* et *Drosophila melanogaster* alors qu'elle semble diminuer les fréquences de catastrophes dans les cultures de cellules de mammifères et chez *Schizosaccharomyces pombe* (Coquelle *et al.*, 2009). Les résultats des études *in vivo* sont contrastés et proviennent de modèles différents, il est donc difficile d'en faire une synthèse claire (Coquelle *et al.*, 2009), toutefois EB1 est en

général considérée comme promouvant la dynamique des microtubules. Chez les plantes, la perte de fonction de EB1a ou EB1b semble confirmer un effet stimulateur de ces protéines sur la dynamique des microtubules (Galva *et al.*, 2014). Les résultats que l'on a pu obtenir concernant la dynamique des microtubules *in vivo*, bien que non significatifs montrent la même tendance. En effet, chez le double mutant utilisé les évènements de catastrophes et de sauvetages semblent légèrement moins fréquents que chez les plantes contrôles. L'effet semble toutefois moins prononcé que dans la lignée *eb1b-2* utilisée par Galva *et al.* 2014. La différence pouvant venir de la mutation de EB1a en plus de celle de EB1b ou de l'allèle de EB1 b utilisé.

In vitro, les résultats disponibles dans la littérature sont un peu plus cohérents. De plus, ces approches permettent d'étudier l'effet de la protéine seule et ainsi de s'affranchir de l'effet de partenaire ou d'autre +TIP. Bien qu'ils puissent différer à la marge, les résultats obtenus par différentes équipes concernant l'effet de EB1 sur la dynamique des microtubules *in vitro* s'accordent sur le fait que EB1 augmente vitesse de croissance et fréquence de catastrophe de l'extrémité (+) (Coquelle *et al.*, 2009, Hamada, 2014). Les expériences réalisées en système purifié avec nos collaborateurs de Grenoble ont permis de reproduire ces résultats concernant EB1 de souris. En revanche, l'utilisation de la protéine EB1b purifiée ne confirme pas l'effet stimulateur sur les fréquences de catastrophes observé *in vivo* par Galva *et al.* 2014. De plus, EB1b et EB1 murin, dans les conditions expérimentales utilisées, diffèrent de par leur effet sur les vitesses de croissance et de dépolymérisation. En effet, alors que EB1 murin augmente la vitesse de croissance (+43%) EB1 b la diminue (-23%). EB1 b diminue également la vitesse de dépolymérisation (-7%). La diminution de la vitesse de polymérisation constatée en présence de EB1 b est en contradiction avec les résultats obtenus en spectrométrie par Komaki *et al.*, 2008. En effet cette étude rapporte un effet positif des EB1 végétales sur la quantité de microtubules observée en turbidité et donc probablement sur la vitesse d'assemblage. Cependant, les conditions d'expérimentations n'étaient pas les mêmes et peuvent expliquer que les résultats obtenus divergent. Les auteurs ont utilisé une quantité de protéine EB1 27 fois plus importante que nous dans un tampon contenant très peu de sels (1 mM MgCl₂). Or, le ratio protéine/tubuline, le type de sel employé ainsi que sa concentration modifient l'assemblage des microtubules (Coquelle *et al.*, 2009). Le ratio EB1/tubuline peut modifier la localisation de EB1 sur les microtubules. En effet, *in vivo* lorsque EB1 est surexprimée (Chan *et al.*, 2003) ou *in vitro* lorsqu'il y en a beaucoup, la

protéine peut se fixer sur le corps du microtubule en plus de l'extrémité (+). Ce second site de liaison pourrait modifier la dynamique des microtubules.

Notre étude *in vitro* indique que EB1b ne modifie pas la fréquence de catastrophe à l'inverse des EB1 de mammifères. EB1 b semble réduire les vitesses d'assemblage et de dépolymérisation. On s'attendrait à ce qu'une réduction de la vitesse de polymérisation, en réduisant la taille de la coiffe GTP/conformationnelle, augmente les fréquences de catastrophes. Or, en présence de EB1b ce paramètre n'est pas modifié. Il est possible que la partie C-ter des EB1 végétales soit responsable des différences constatées *in vitro* entre EB1 murin et EB1b. Toutefois, *In vivo* l'absence de EB1a et de EB1b ne semble pas modifier la dynamique du réseau cortical de façon drastique puisque, comme nous l'avons montré, celui-ci est toujours à même de changer d'orientation suite à un traitement par l'auxine, ce qui suggère que les EB1 végétale soient peu impliquées dans la régulation de la dynamique des microtubules *in vivo*.

Dynamique des microtubules et organisation du réseau

L'organisation du réseau de microtubules, bien qu'elle puisse être stable dans le temps, dépend de sa dynamique. Le réseau cortical des cellules en élongation de l'hypocotyle apparaît transverse pendant des heures voir des jours. Toutefois, les microtubules qui constituent le réseau sont dynamique et le réseau oscille autour d'un axe transversal (Chan *et al.*, 2007). La dynamique des microtubules est indispensable à l'organisation du réseau, les mutants thermo-inductibles de MOR1/XMAP215 ont des microtubules très peu dynamiques, très courts, et le réseau présente une organisation isotrope à la température restrictive (Kawamura *et al.*, 2006). Toutefois, de faibles modifications de la dynamique des microtubules ne perturbent pas nécessairement l'organisation du réseau, le mutant *eb1b-2* dont la dynamique des microtubules est légèrement perturbée ne présente pas de désorganisation du réseau cortical.

Rôle de EB1 dans la formation des faisceaux de microtubules

Comme nous l'avons présenté dans la troisième partie de l'introduction, les microtubules peuvent s'associer latéralement pour former des faisceaux. Cette association est possible notamment par l'intervention de protéines de pontage qui vont lier ensemble les

microtubules du faisceau. La formation de faisceaux a lieu après un évènement de croisement ou après une nucléation parallèle. En absence des protéines EB1a et EB1b nous avons observé une diminution du nombre de microtubules par faisceaux. L'implication de EB1 dans la formation des faisceaux de microtubules n'a jamais été montrée dans les animaux. En revanche, EB1 de souris semble promouvoir la formation de faisceaux de microtubules dans les plantes lorsqu'elle y est surexprimée (Mathur *et al.*, 2003). Le mécanisme impliquant EB1 dans la formation des faisceaux pourrait donc être commun aux animaux et aux plantes. EB1 étant une protéine localisée à l'extrémité (+) des microtubules, il est difficile de concevoir qu'elle puisse augmenter la stabilité des faisceaux, en revanche, deux mécanismes, non mutuellement exclusifs pourraient expliquer le rôle de EB1 dans la formation des faisceaux.

D'une part, chez les animaux, EB1 est associée avec l'extrémité (+) des microtubules mais aussi avec le matériel péri-centriolaire (Louie *et al.*, 2004). Cette seconde localisation implique la protéine dans la nucléation des microtubules (Rogers *et al.*, 2008) chez la drosophile. Chez les plantes, EB1 n'a jamais été observée au niveau des complexes de nucléation, toutefois, la protéine semble être parfois associée avec l'extrémité (-) des microtubules (Chan *et al.*, 2003), celle associée au complexe de nucléation. Si le rôle de EB1 dans la nucléation des microtubules, observé dans les animaux, était conservé chez les plantes, particulièrement pour la nucléation parallèle, alors en absence de la protéine, l'occurrence des faisceaux serait réduite.

D'autre part, en étant localisée à l'extrémité (+) des microtubules EB1 a et EB1b peuvent être impliquées dans la formation de faisceaux suite à un croisement. En effet, on peut imaginer que la protéine ou des partenaires recrutés par EB1 à l'extrémité (+) puisse intervenir au moment du croisement pour faciliter l'alignement du microtubule incident sur celui déjà existant. En absence de EB1 à l'extrémité (+), lors d'un croisement le microtubule incident aurait plus de difficultés à s'aligner. Ce second mécanisme pourrait faire intervenir MAP65-1. Cette protéine est connue pour faciliter la formation de faisceaux *in vitro* en assouplissant le microtubule incident, lui permettant ainsi de s'aligner pour former un faisceau. L'interaction entre EB1 et MAP65-1 est prédite par la base de données ANAP (Arabidopsis Network Analysis Pipeline) et l'interaction génétique entre MAL3 (orthologue de EB1) et ASE1 (orthologue de MAP65-1) est suggérée dans Dixon *et al.*, 2008. Si la présence de EB1 à l'extrémité (+) permet de recruter, ne serait-ce, que quelques protéines

MAP65-1 lors d'un croisement, elles pourraient initier la formation du faisceau en stabilisant le rapprochement des deux microtubules. Ce rapprochement recruterait alors de nouvelles protéines stabilisant le faisceau.

Organisation du réseau cortical et formation des faisceaux de microtubules

Chez le double mutant *eb1a-2 eb1b-3*, le nombre de microtubules par faisceaux est réduit et le réseau cortical de microtubule est partiellement désorganisé. Le lien entre ces deux phénotypes n'est pas établi clairement dans la littérature, bien que la simulation publiée par différentes équipes (Dixit et Cyr, 2004, 2010, Eren *et al.*, 2010, Eren *et al.*, 2012) indiquent une participation de la formation des faisceaux à l'organisation globale du réseau (voir Introduction chapitre 3).

Dans le but d'étudier plus en détail la relation possible entre formation de faisceaux et organisation du réseau de microtubules, nous avons d'exploré l'organisation du réseau et l'occurrence des faisceaux Chez un mutant de MAP65-1. Cette protéine étant connue pour son rôle dans la formation de faisceaux *in vitro* et pour son association préférentielle avec les faisceaux de microtubules *in vivo*, il était intéressant de voir si le réseau cortical était désorganisé dans une lignée perte de fonction qui a de grande chance de présenter moins de faisceaux de microtubules. Premièrement, il est important de remarquer qu'une réduction de l'occurrence des faisceaux de microtubule Chez un mutant perte de fonction de MAP65-1 n'a jamais été démontrée. Deuxièmement, en utilisant la méthode de quantification développée au cours de cette thèse (Résultats Figure 8), nous avons pu montrer que le mutant perte de fonction contient moins de faisceaux de plus de 2 microtubules que la lignée complémentée. Enfin, une corrélation entre diminution du nombre de faisceaux et désorganisation du réseau peut être établie puisqu'il est apparu que le réseau cortical de microtubules présente un score d'anisotropie plus faible chez le mutant *map65-1*. Les pertes de fonction de MAP65-1 ou des deux isoformes cytosoliques de EB1 provoquent toutes les deux une désorganisation du réseau accompagnée de la réduction du nombre de faisceaux de microtubules. Bien qu'il demeure possible que les deux mécanismes (*i.e* formation des faisceaux et organisation du réseau) soient indépendants, un certain nombre d'indices laissent à penser que les deux mécanismes sont reliés de façon à ce que la formation de faisceaux renforce l'organisation du réseau.

Il semble que plus que la simple formation de faisceaux, ce soit les contacts entre microtubule qui soient important pour l'organisation du réseau. En effet, lorsque deux microtubules se croisent il en résulte : soit la formation d'un faisceau, soit une catastrophe induite par le croisement, soit un simple croisement. Les simulations indiquent qu'en plus de la formation de faisceaux, il faut que les angles de croisements obtus induisent des catastrophes pour permettre au réseau de s'organiser. En effet, l'organisation du réseau nécessite une double régulation ; l'organisation parallèles des microtubules qui convergent (formation de faisceaux) et l'élimination des microtubules trop divergents (catastrophes induites). Ce constat est renforcé par le fait que le mutant perte de fonction de la protéine MOR1, l'homologue de XMAP215 chez *A.thaliana*, présente un réseau de microtubules désorganisé et composés principalement de microtubules très courts (Whittington *et al.*, 2001, Dixit et Cyr, 2004). Il est possible que la perturbation de la dynamique des microtubules en absence de MOR1 ne permette pas à ces derniers d'atteindre une taille suffisante pour que des évènements de croisements ait lieu. En absence d'évènements de croisement aucune organisation du réseau n'émerge, les microtubules divergents ne sont pas éliminés, ceux convergeant ne sont pas associés en faisceaux.

Il est intéressant de remarqué que la nucléation, qui est impliquée dans la formation de faisceaux, semble également jouer un rôle mineur dans l'organisation du réseau cortical (Eren *et al.*, 2010). Il est donc plus facile d'expliquer la désorganisation du réseau cortical chez le double mutant *eb1a-2 eb1b-3* par un rôle d'EB1, encore à démontrer formellement, dans la formation de faisceaux lors d'évènements de rencontre que par un rôle d'EB1 dans la nucléation de microtubules.

3) Intégration multi-échelle des phénotypes : proposition d'un modèle de travail

Organisation du réseau cortical de microtubules et synthèse de la paroi cellulaire

Les cellules végétales sont entourées d'une paroi cellulaire. Cette paroi est composée principalement de fibres de cellulose. Ces fibres de cellulose sont synthétisées par des enzymes membranaires, les cellulose synthases (CESA). La paroi, assez épaisse, est constituée de multiples couches. Chaque couche de paroi contient des fibres de cellulose organisées selon une direction différente. Il est apparu très tôt que l'organisation de la couche de paroi la plus récente, celle en contact avec la membrane plasmique semblait suivre l'organisation du réseau de microtubules situé juste en dessous de la membrane (Ledbetter et

Porter, 1963). Depuis, différentes expériences ont permis de confirmer le rôle du réseau de microtubules dans la synthèse de la paroi et notamment dans l'orientation des fibres de celluloses (Baskin, 2001). A la différence du réseau de microtubules, une fois mise en place l'organisation des fibres de cellulose ne change plus au cours du temps ou très peu. Chaque couche de paroi est donc en quelque sorte un indicateur de la façon dont le réseau de microtubules était organisé au moment de sa synthèse. Lorsque la paroi du double mutant *eb1a-2 eb1b-3* est analysée par FTIR, il apparaît qu'elle est significativement désorganisée, dans les cellules en élongation de l'hypocotyle étioilé, comparée à celle de plantes sauvages. La désorganisation de la paroi suggère que le réseau de microtubules dont la paroi suit l'orientation est lui-même désorganisé dans ces cellules. Les résultats du FTIR permettent donc de confirmer la désorganisation des microtubules observée en microscopie confocale. Les résultats du FTIR indiquent aussi que la désorganisation constatée dans les cellules élongation n'est plus détectable en bas de l'hypocotyle, dans les cellules dont l'élongation est terminée. Il se peut que le réseau de microtubules dans ces cellules ait une organisation comparable à celle des cellules sauvages et que les couches de paroi « bien organisée » ajoutées après la phase d'élongation masquent la désorganisation des premières couches de paroi synthétisées, qui elles étaient désorganisées. Il se peut également qu'il y ait un mécanisme de « réparation » qui va modifier la paroi après sa synthèse de façon à compenser son défaut d'organisation. De plus, la paroi des simples mutants *eb1a-2* et *eb1b-3* ne semble pas désorganisée dans les cellules en élongation. La mutation des deux gènes paraît nécessaire à l'obtention du phénotype pariétale. La fonction de ces deux gènes pourrait donc être redondant, au moins en ce qui concerne l'organisation de la paroi.

Phénotype macroscopique chez les mutants de EB1

Les plantes mutantes pour chacune des trois isoformes végétales de EB1 ne présentent pas de phénotypes drastiques à l'âge adulte. Seule une déviation de la racine a été observée lorsque les plantes croissent sur milieu gélosé vertical (Bisgrove *et al.*, 2008, Gleeson *et al.*, 2012). Cette déviation de la racine rapportée par Bisgrove *et al.* pour des mutants obtenus dans le fond génétique (WS) et un mutant de EB1b dans le fond génétique Col-0, n'a pas été observée par Komaki *et al.* chez les mutants qu'ils ont obtenus dans le fond génétique Col-0 (Komaki *et al.*, 2010).

Entre nos mains, le double mutant *eb1b-2 eb1b-3* (Col-0) de Komaki *et al.* présente une déviation de la racine similaire à ce qui a été publié précédemment. En revanche, les simples mutants n'ont pas tous le même comportement. En effet, le simple mutant *eb1a-2* (Col-0) ne présente pas de déviation de la racine alors que le simple mutant *eb1b-3* (Col-0) est aussi dévié que le double mutant. Les mutants décrits par Bisgrove *et al.* montrent le même comportement ; le double mutant *eb1a-1 eb1b-1* (WS) présente une déviation de la racine équivalente à celle du simple mutant *eb1b-1* (WS) alors que le simple mutant *eb1a-1* (WS) n'est pas dévié comparé au sauvage. Il semble donc que les gènes EB1A et EB1B ne soient pas complètement redondant bien que les séquences en acides aminés des protéines soient très comparable. De façon surprenante le double mutant *eb1a-2 eb1b-3* (Col-0) que l'on a utilisé possède également une racine légèrement plus courte que les plantes sauvages après 7 jours de croissance sur boîtes verticales. Ce phénotype n'avait jamais été observé chez les mutants de EB1 jusqu'ici. De plus, ce phénotype de raccourcissement de la racine n'est observable que chez le double mutant, les simples mutants correspondants ont une racine de taille similaire au sauvage. Il semble donc que les gènes EB1A et EB1B soient redondants en ce qui concerne leur fonction dans le contrôle de la taille de la racine. Toutefois, ce défaut de taille racinaire ne semble pas être causé par le défaut de division cellulaire observé par Komaki *et al.* chez ces mutants puisque les tailles des méristèmes racinaires du sauvage et du double mutant *eb1a-2 eb1b-3* sont similaires.

Le double mutant exprimant la construction rapporteur possède une racine déviée et plus courte comparé aux plantes sauvages exprimant la même construction. L'expression de la fusion GFP-tubuline- α -6 chez les plantes sauvage ou double mutant ne modifie donc pas les phénotypes racinaires observés.

Organisation du réseau cortical de microtubules et propriétés mécaniques des cellules végétales

Comme nous venons de le voir les cellules végétales sont entourées d'une paroi. La paroi est rigide et maintient la forme de la cellule. A l'opposé d'une cellule animale dont le cytosquelette est impliqué dans les mécanismes de changement de forme et de déplacement, une cellule végétale ne se déplace pas. En revanche une cellule végétale est soumise à la fois à la pression de turgescence de sa vacuole et à la pression de ses voisines. C'est la combinaison de la pression de turgescence des cellules végétales contenue par la rigidité de la paroi qui

confère aux plantes leur rigidité et leur permet de s'élever contre la gravité. Dans les cellules végétales, le cytosquelette serait d'avantage impliqué dans la détection des contraintes mécaniques issues de l'environnement de la cellule que dans le maintien de sa forme (Nick, 2013). En effet, l'orientation du réseau cortical de microtubules dépend de l'environnement mécanique de la cellule. Les travaux d'Olivier Hamant et de ses collaborateurs ont démontré l'existence d'une boucle de rétrocontrôle entre l'orientation du réseau cortical de microtubules et les tensions mécaniques existantes dans le méristème apical caulinaire, l'épiderme des feuilles et les sépales (Hervieux *et al.*, 2016; Burian *et al.*, 2013; Hamant *et al.*, 2008). Les mécanismes expliquant ces changements d'orientation ne sont pas complètement élucidés. Il est possible que les microtubules répondent eux même aux modifications de l'environnement mécanique. En effet, des forces de compressions et de tensions appliquées aux microtubules modifient leur propriété dynamique ; les premières induisent des catastrophes quand les secondes favorisent la polymérisation (Zheng *et al.*, 1993, Putnam *et al.*, 1998, Janson et Dogterom, 2004). L'orientation des microtubules peut également être contrôlée par des cascades de régulation activées par les tensions membranaires et pariétales résultant de la modification de l'environnement mécanique. Les effecteurs en amont de ces cascades de régulations n'ont pas encore été clairement identifiés mais ils pourraient s'agir (1) de composés pariétaux (cellulose ou pectine), se déformant suivant les contraintes et dont la déformation pourrait être traduite en cascade de signalisation ; (2) de canaux ioniques mécano-sensibles déclenchant le mouvement de certains ions suite à leur ouverture par l'augmentation de la tension membranaire. (Nick 2013, Landrein et Hamant 2013).

En plus de répondre à l'environnement mécanique de la cellule, les microtubules semblent influencer les propriétés mécaniques de la cellule. En effet, une étude de rhéologie de cellules isolées a montré que le réseau de microtubule participe bien plus que l'actine à l'établissement des propriétés mécaniques des protoplastes (cellules sans paroi). Le constat est inversé dans des cellules animales où l'actine est le filament du cytosquelette qui influence le plus les propriétés visco-élastiques des cellules isolées (Durand-Smet *et al.*, 2014).

Chez le double mutant *eb1a-2 eb1b-3* la perception de stimuli mécaniques semble altérée. Ce phénotype peut s'expliquer de différentes manières. (1) La désorganisation du réseau et notamment de la diminution du nombre de microtubules par faisceaux sont à même de modifier les propriétés mécaniques des cellules puisque les faisceaux de microtubules, de

par leur grande résistance, pourraient participer grandement à l'établissement des propriétés mécaniques ces cellules. En absence de EB1a et EB1b les propriétés mécaniques des cellules seraient modifiées, ce qui modifierait la capacité de la plante à percevoir des stimuli mécaniques. (2) EB1 promeut la formation de microtubules à 13 protofilaments et 3 hélices latérales (Vitre *et al.*, 2008), qui est la forme la moins instable de microtubule. L'absence de EB1 pourrait donc modifier la proportion de microtubules en 13-3, rendant le réseau plus sensibles aux effets des compréhensions et tensions décrits précédemment. (3) EB1 pourrait également être impliqué dans la cascade de signalisation (Gleeson *et al.*, 2012) en aval de la perception du stimulus mécanique.

La balance gravitropisme – thigmotropisme

La racines des plantes à une croissance dite à géotropisme positif, c'est-à-dire que la racine suit le vecteur de gravité. Cette capacité repose sur un mécanisme de détection et un mécanisme de réorientation. La détection du vecteur de gravité repose notamment sur la sédimentation des statolithes. Ce sont des amyloplastés présents dans les statocystes, les cellules les plus apicales de la racine, au niveau de la coiffe. La sédimentation des statolithes dans les statocystes permet à la plante de détecter le sens du vecteur de gravité. Cette détection impliquerait la déformation du reticulum endoplasmique par les statolithes (Leitz *et al.*, 2009); déformation qui conduirait à l'activation de canaux mécano-sensibles qui déclencherait une cascade de signalisation à l'origine de la réorientation de la racine pour retrouver le vecteur de gravité. Le mécanisme de détection n'est pas complètement élucidé et pourrait également impliquer le cytosquelette. En effet, les statolithes pourraient y être ancré ou interagir avec de façon à lui transmettre l'information concernant l'orientation de leur sédimentation.

Le mécanisme de réorientation qui suit la détection est mieux décrit, il implique une modification de la concentration en auxine entre les deux faces de la racine. L'auxine étant une hormone végétale impliquée dans le contrôle de l'élongation cellulaire, la modification de sa répartition dans les cellules en élongation de la racine va provoquer un différentiel de croissance entre les faces supérieure et inférieure de la racine. La différence d'élongation entre les deux faces va provoquer la courbure de la racine dans le sens du vecteur de gravité.

Comme tous les tropismes, le géotropisme positif de la racine n'est pas parfait, c'est en quelque sorte un équilibre instable. Même en absence de stimulation, la racine est constamment en train d'ajuster sa croissance pour se rapprocher du vecteur de gravité. Lorsque la racine n'est pas alignée avec le vecteur de gravité, la contre mesure mise en place est souvent excessive de sorte que la racine tourne autour de l'axe de gravité sans jamais s'aligner parfaitement avec celui ci. En sus de ce géotropisme positif la racine à un thigmotropisme négatif. La racine évite les obstacles qu'elle rencontre. Le mécanisme d'évitement (perception de l'obstacle) est moins bien décrit mais il pourrait impliquer des canaux ioniques du plasmalemme et le cytosquelette. Suite à l'évènement de rencontre, la cascade de signalisation aboutit à une réorientation de la croissance de la racine. Cette étape finale est probablement très similaire au mécanisme de réorientation nécessaire au gravitropisme positif. En effet, il implique lui aussi un gradient d'auxine et un différentiel de croissance entre les deux faces de la racine.

Lorsque des plantules d'*Arabidopsis* sont cultivées sur du milieu gélosé vertical, la combinaison de ces deux tropismes conduit la racine à avoir une croissance en vaguelette. En effet, la rencontre entre l'extrémité de la racine et le milieu donne lieu à un évitement (thigmotropisme négatif). La racine se courbe pour éviter le milieu. Cet évènement éloigne la pointe racinaire du vecteur de gravité. Le géotropisme positif induit une seconde courbure, opposée à la première pour ramener la pointe racinaire vers le vecteur de gravité et donc vers le milieu, qu'elle va rencontrer, et ainsi de suite. S'ajoute à ce schéma le fait que la racine d'*Arabidopsis* ait une croissance hélicoïdale droite (Migliaccio *et al.*, 2013). Les mécanismes responsables de cette croissance hélicoïdale ne sont pas élucidés mais ils pourraient impliquer le transport d'auxine. Les racines de plantules sauvages d'*Arabidopsis thaliana* qui poussent sur un milieu gélosé vertical répondent donc à ces trois mécanismes (gravitropisme positif, thigmotropisme négatif, croissance hélicoïdale) ce qui produit une racine en forme de tire-bouchon aplati.

Chez les mutants de EB1, la déviation de la racine vers la droite, décrite précédemment, serait causée par un déséquilibre entre gravitropisme et thigmotropisme dans le contexte des processus présentées précédemment. La racine des simples mutants de EB1 est capable de retrouver le sens du vecteur de gravité lorsque les boîtes sont tournées vers la droite ou la gauche de 90°. Bien que le temps nécessaire à la racine pour retrouver le vecteur ne soit pas le

même dans les deux sens, cela qui indique néanmoins que le gravitropisme fonctionne correctement chez ces mutants (Bisgrove *et al.*, 2008). EB1 ne semble donc pas impliqué dans le mécanisme de détection du sens du vecteur de gravité. En revanche les racines des mutants de EB1 mettent plus de temps à retrouver le sens du vecteur de gravité lorsqu'elles ont eu à éviter un obstacle. Ce qui indique que ces mutants sont hypersensibles au toucher, ils répondent trop aux stimulations mécaniques. Ce déséquilibre entre gravitropisme et thigmotropisme chez les mutants d'EB1 est à même de causer la déviation de la racine. En effet, sur un milieu gélosé vertical la racine des mutants touche le milieu et se courbe pour l'éviter seulement elle met plus de temps à induire la courbure opposée sensée la ramener en contact avec le milieu. Ce délais, combiné au fait que la croissance est hélicoïdale conduit à une légère déviation vers la droite (dans le sens de l'hélice) à chaque fois que la racine touche et évite le milieu (Figure 45). L'hypersensibilité de la racine des mutants de EB1 aux événements de contact et le déséquilibre entre gravitropisme et thigmotropisme peuvent être causés par les phénotypes sub-cellulaires que nous avons constaté. En effet, le réseau cortical de microtubule étant impliqué à la fois dans l'établissement des propriétés mécaniques des cellules végétales et dans la signalisation mécanique, on peut supposer que lorsque ce réseau est désorganisé et contient moins de faisceaux, ces mécanismes soient affectés. Si les cellules du double mutant étaient légèrement plus souples, à cause des phénotypes microtubulaires et pariétaux constatés, alors cela expliquerait l'hypersensibilité puisqu'un même stimulus perturberait le système beaucoup plus et plus durablement. Alternativement, il est possible que ce soit la détection de la perturbation ou la cascade de signalisation, indépendamment des propriétés mécaniques, qui soient perturbées par la désorganisation du réseau cortical.

4) Des phénotypes faibles mais néanmoins intéressants

Chez les plantes, les mutants de EB1 ont toujours présenté des phénotypes plutôt faibles (Bisgrove *et al.*, 2008, Komaki *et al.*, 2010, Gleeson *et al.*, 2012, Galva *et al.*, 2014) bien que significatifs. C'est également le cas dans un certain nombre d'autres organismes eucaryotes tels que *Schizosaccharomyces pombe* (Chen *et al.*, 2000), *Saccharomyces cerevisiae* (Miller *et al.*, 2000), et *Dictyostelium* (Rehberg et Graf, 2002). Les nouveaux phénotypes sub-cellulaires constatés dans cette étude sont eux aussi relativement faibles de l'ordre de 10 à 20% de différences entre sauvage et double mutant. Cependant, ils sont significatifs et visualisés à différentes échelles, se renforçant les uns les autres. Il peut être délicat de travailler avec ce genre de mutants car ils présentent souvent des phénotypes difficiles à

observer. Toutefois, ils ont l'avantage de perturber un processus sans l'abolir. Le processus en question reste donc observable, ce qui permet de décrire plus précisément l'implication de la protéine mutée dans ce processus. Il est également possible que les conditions dans lesquelles les organismes sont étudiés ne permettent pas de révéler les phénotypes les plus drastiques. En effet, en général les organismes étudiés sont cultivés dans des conditions optimales. Parfois, certains stress sont appliqués, mais leurs fréquences et leurs intensités n'ont rien à voir avec ce que l'organisme peut rencontrer dans la nature de sorte qu'ils ne révèlent pas forcément toutes les fonctions du gène ou de la protéine.

Perspectives

Explorer la conservation des fonctions de EB1 entre les plantes

Comme nous l'avons vu en discussion, le travail réalisé pendant cette thèse s'est surtout concentré sur le réseau cortical de la face externe de cellules d'hypocotyle étiolé. Dans le but de vérifier la conservation des fonctions de EB1 parmi les plantes supérieures il pourrait être intéressant de reproduire les expériences réalisées durant cette thèse dans d'autres plantes modèle telle que le riz, le tabac ou la tomate. La conservation des fonctions de EB1 dans la lignée verte pourrait être explorée en utilisant *Chlamydomonas reinhardtii* et *Physcomitrella patens*.

Prospecter la diversité entre EB1 végétale et animale

L'effet des EB1 végétales sur la dynamique des microtubules semble légèrement différent de celui de EB1 murin d'après nos résultats obtenus en système purifiés. Pour compléter l'étude il serait intéressant de comparer EB1 a, EB1 b et EB1 c à EB1 murin. Des protéines chimériques entre les extrémités C-ter et N-ter des EB1 végétales et des EB1 de mammifères permettraient de mieux comprendre l'origine des différents effets constatés. L'utilisation de doses croissantes de EB1 permettrait de vérifier si la différence entre nos résultats et ceux de Komaki *et al.* concernant l'effet sur la vitesse de polymérisation est dû à la dose de protéine employée ou à un autre paramètre. De plus, la spécificité des EB1 végétales pourrait être analysée en réalisant des complémentations fonctionnelles par l'expression de la version de mammifère chez des plantes mutantes pour EB1. L'inverse serait également informatif.

Examiner le lien entre formation de faisceaux et organisation du réseau

Le rôle de EB1 dans la formation des faisceaux de microtubules et dans l'organisation du réseau cortical interroge le lien entre ces deux niveaux de régulation. Ce lien a été exploré via des simulations informatiques mais jamais expérimentalement démontré. Le fait que les mutants de EB1 et de MAP65-1 présentent tous les deux ces deux phénotypes renforce l'idée que la formation de faisceaux participe à l'organisation du réseau. Le croisement de ces mutants ensemble ainsi qu'avec d'autres MAP impliquées dans la formation de faisceaux comme MAP65-4 ou dans l'organisation du réseau comme SPIRALE permettrait, peut-être,

d'apporter des éléments expérimentaux confirment ce lien. De plus, une meilleure description du rôle de EB1 et de MAP65-1 dans la formation de faisceaux viendra probablement de l'observation du comportement des microtubules à chaque croisement dans des expériences en systèmes purifiés mais également *in vivo* chez les mutants de ces protéines. L'analyse des fréquences de nucléation parallèle et branchée chez les mutants de EB1 permettra également d'évaluer la participation de EB1 dans ce mécanisme.

Approfondir la relation entre phénotypes microtubulaires et propriétés mécaniques

Le modèle de travail proposé dans cette étude permet de faire le lien entre les phénotypes observés à différents niveaux d'investigation. Dans un premier temps, le phénotype pariétal pourrait être approfondi en visualisant l'organisation des fibres de cellulose par microscopie à force atomique ou en microscopie électronique en transmission. L'observation du mouvement des enzymes de sécrétion de la paroi chez les mutants de EB1 et de MAP65-1 apportera des informations sur le rôle des faisceaux de microtubules dans la synthèse pariétale. La participation des phénotypes microtubulaires à une possible modification des propriétés mécaniques des cellules chez le double mutant *eb1a-2 eb1b-3* et le mutant *map65-1.1* pourrait être examinée en mesurant les propriétés mécaniques des protoplastes (Annexe 6) voir même de différents organes par AFM. Le fonctionnement des stomates semble impliquer à la fois la formation de faisceaux de microtubules et la déformation des cellules de gardes. Analyser le fonctionnement des stomates chez les mutants de EB1 et de MAP65-1 permettrait de confirmer le rôle des faisceaux dans le mécanisme d'ouverture des stomates, ce qui pourrait être un point de départ pour cribler de nouveau gène impliqués dans la formation de faisceaux de microtubules.

Matériel et méthodes

1) Lignées et constructions

	Nom	Construction	Mutation	Référence
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GFP-TuA6	35S ::GFP :TuA6		Komaki <i>et al.</i> 2010
	KOMap65-1 GFP-TuA6	35S ::GFP :TuA6	tDNA	M. Vantard non publié
	KOMap65-1 GFP-TuA6 MAP65-1-RFP	35S ::GFP :TuA6 pMAP65-1 ::MAP65-1 :RFP	tDNA	M. Vantard non publié
	<i>eb1a-2</i>		tDNA	Komaki <i>et al.</i> 2010
	<i>eb1b-3</i>		SNP	Komaki <i>et al.</i> 2010
	<i>eb1a-2 eb1b-3</i>		tDNA SNP	
	<i>eb1a-2 eb1b-3</i> GFP-TuA6	35S ::GFP :TuA6	tDNA SNP	Komaki <i>et al.</i> 2010
<i>E.Coli</i>	Plasmide	pT7:LacOp::FLAG:6xHis:Eb1b		Komaki <i>et al.</i> 2010
	Souche	BL21 pLys S		
Plasmide d'expression dans <i>A. thaliana</i>		2x35S::PS:mCherry:HDEL		Nelson <i>et al.</i> 2007

Les lignées *eb1a-2*, *eb1b-3*, *eb1a-2 eb1b-3* 35S::GFP:TuA6 et 35S::GFP:TuA6 nous ont été fournies par le professeur T.Ashimoto (Komaki *et al.*, 2010). Le double mutant *eb1a-2 eb1b-3* a été obtenu par croisement des lignées des simples mutants correspondants. L'insertion de l'ADNt responsable de la mutation *eb1a-2* a été détectée par PCR (5'-AAC GTC CGC AAT GTG TTA TTA AGT TGT C -3' et 5'-GCA AAC AAA CAA TAA CCA

TC -3'). La substitution responsable de la mutation *eb1b-3* a été analysée par digestion enzymatique par l'enzyme MseI (Thermo Scientific FD2174) des fragments de PCR obtenus avec les amorces suivantes : 5'- TTG AAG CAA AGA ACG AGT ACG A -3' et 5'- TGG AAG TAG CCA CAG GAG GA -3'. Le programme de PCR comprenait 30 cycles constitués de 30 secondes à 92°C, 30 secondes à 55°C et 30 secondes à 72°C. Le premier cycle était précédé d'une étape de 5 minutes à 92°C et le dernier cycle était suivi d'une étape de 5 minutes à 72°C.

2) Milieux de cultures

Le milieu utilisé pour la culture des plantes ou lors des observations microscopiques est un milieu ½ Murashig and Skoog (MS) contenant 5 g de Saccharose, 0.59 g d'acide 2-(N-morpholino)ethanesulfonique (MES) et 2.15 g de Murashig and Skoog par litre. Le milieu est tamponné à pH 5,6 avec de l'hydroxyde de potassium avant d'être stérilisé en cocotte-minute (20 minutes à 120°C puis 20 minutes à 210°C). Lors de la préparation du milieu pour la culture *in vitro* en boîtes de Petri, l'agent gélifiant est ajouté juste avant la stérilisation. Suivant les expériences il s'agit de gelrite (Gelzan) ou d'agar à des concentrations de 3, 6 ou 9 grammes par litre. Le milieu est coulé dans les boîtes de Petri juste après la stérilisation.

Les agrobactéries sont cultivées dans du milieu 2YT (16 g de Bacto Tryptone, 10 g de Bacto Yeast Extract, 5 g de NaCl par litre d'eau, pH 7).

Le milieu de culture de E.Coli est un milieu LB à 2,5% (Broth Miller).

3) Conditions de cultures

a) *Arabidopsis thaliana*

Les graines sont stérilisées, par petites quantités (< à 100µL), dans des tubes 2 mL, par un traitement de 10 minutes avec une solution d'éthanol 70% contenant 0,05% de Tween 100. Les graines sont ensuite rincées 1 minute dans une solution d'éthanol à 95% avant d'être laissées à sécher sous une hotte stérile.

Une fois stérilisées, les graines sont semées sur les milieux gélifiés avec un cure-dents stérile avant de passer au minimum 18 h à 4°C. Ensuite, les graines sont placées dans des enceintes de culture (SANYO) à 20°C et un éclairage de 16h par jour. Pour la microscopie de

l'hypocotyle, les plantules croissent en conditions d'étiollement. Après avoir passé 6h à la lumière dans les enceintes de culture, les boîtes de Petri sont emballées dans de l'aluminium et placées dans une boîte en carton à l'intérieur de l'enceinte de culture.

b) *Agrobacterium tumefaciens*

Les agrobactéries sont cultivées dans du milieu 2YT à 30°C et utilisées pendant leur phase exponentielle de croissance.

c) *Escherichia coli*

Du milieu LB estensemencé de bactéries à DO 0,05 puis la croissance bactérienne à 37°C est suivie par densité optique. Lorsque la culture atteint DO=0,5 les cultures sont transférées à 32°C et 1mM d'IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) est ajouté pour induire la production de la protéine. Après 5h de culture à 32°C les bactéries sont centrifugées à 4°C, 5000 g pendant 15 minutes. Le surnageant est retiré et les culots bactériens congelés dans l'azote liquide.

4) Conditions d'observations

a) Plantules entières

Pour la mesure de la taille et de la déviation de la racine, après 7 jours de croissance les boites contenant les plantules sont ouvertes, placées horizontalement, les plantules face à l'appareil photo, et prise en photo. Pour le suivi de la croissance racinaire les boîtes sont observées chaque jour à la même heure. Les boîtes sont manipulées précautionneusement de façon à les garder verticales. Chaque jour la portion de racine correspondant à la croissance des 24 dernières heures est dessinée sur le fond de la boîte avec un feutre d'une couleur différente. Après 7 jours d'observation (5 points, j3, j4, j5, j6, j7), les boîtes sont ouvertes, placées horizontalement, le fond de la boîte face à l'appareil photo, et prises en photo.

b) Microscopie

Dans toutes les expériences de microscopie, pour éviter le stress lié à l'observation et la ré-orientation du réseau de microtubules dû à l'illumination le temps d'observation des plantules n'a jamais dépassé 20 minutes après le montage entre lame et lamelle dans du milieu ½ M&S liquide.

i. Organisation du réseau cortical

Les images ont été acquises avec un microscope confocal de type « Spinning Disk » (Nipkow Spinning Disk, Yokogawa CSU-X1-A1) monté sur un statif inversé (Nikon Eclipse Ti E) équipé d'un objectif Nikon APO TIRF X100/1,49 à immersion à huile. Nous avons utilisé, pour visualiser la GFP, un miroir dichroïque (Semrock) à une raie de 491nm couplé à un filtre d'émission passe-bande (Semrock) 525/45nm. Les images ont été prises avec une caméra CoolSNAP HQ2 CCD (Photometrics). Un laser bleu (491 nm Cobolt Calypso DPSS, 100mW) permettait l'excitation de la GFP.

ii. Instabilité dynamique des microtubules

Les films ont été obtenus en fluorescence par réflexion totale interne en utilisant un statif inversé (Nikon Eclipse Ti E) équipé d'une unité d'illumination en réflexion totale interne (Nikon TIRF Illuminator Unit) et d'un objectif Nikon APO TIRF X100/1,49 à immersion à huile. Nous avons utilisé un miroir dichroïque à triple raie band 405/491/561 nm (Semrock) combiné à un filtre d'émission passe-bande (Chroma) 525/50nm. Les paramètres de photo-blanchiment étaient contrôlés par le module iLAS2 (Roper Scientifics). L'ensemble du système est contrôlé par le logiciel MetaMorph (Molecular Devices). Les images ont été prises avec une caméra CoolSNAP HQ2 CCD (Photometrics). Un laser bleu (491 nm Cobolt Calypso DPSS, 100mW) permettait l'excitation de la GFP et le photo-blanchiment.

iii. Super-résolution

L'acquisition des images en STED sur des plantules vivantes a été réalisée sur un microscope DMi 6000 TCS SP8X – gated STED (LEICA) équipé d'un objectif HCX PL APO 100x/1,40 STED à immersion à huile et d'un laser de déplétion à 592 nm. Le mode séquentiel a été utilisé pour permettre l'acquisition en mode STED et en mode confocale d'un même champ d'observation. Les lasers de déplétion et d'excitation étaient utilisés pour la séquence STED, le laser de déplétion était éteint pour la séquence confocale. La fluorescence a été récoltée avec un détecteur hybride GaAsP (Hamamatsu) en mode « time-gating » (1 ns à 6 ns) avec une quadruple accumulation pour chaque ligne. Le zoom numérique (x 5,7) et la taille des images (1024*1024) ont été choisis pour que la taille finale du pixel soit de 20 nm. La vitesse de balayage réglée à 400 Hz est un compromis entre le signal et le mouvement de

l'échantillon vivant. Les images STED et confocale ont été débruitées en utilisant le module Huygens (Scientific Volume Imaging, Hilversum, The Netherlands) dédié au STED.

iv. Méristème apical racinaire

L'observation de la taille des méristèmes apicaux racinaires de plantules sauvage et double mutant *eb1a-2 eb1b-3* a été réalisée sur des plantules de 7 jours, avec un DMi 6000 TCS SP8X (Leica) équipé d'un objectif 40x PLAN APO 1,40.

v. Analyse de la paroi

Pour l'analyse en FTIR, des plantules étiolées de 4 jours ont été fixées dans l'éthanol 70% (v/v) avant d'être transférées dans l'eau la veille de l'acquisition des données. Les plantules réhydratées ont été placées sur une lame de microscopie recouverte d'or et laissées à sécher pendant 20 minutes à 37°C. Les zones d'acquisitions étaient le haut (avant la crosse), le milieu et le bas de l'hypocotyle. Les spectres ont été collectés avec un microscope Thermo Scientific Nicolet iN10 MX FT-IR. Huit interférogrammes ont été collectés en mode réflexion avec une résolution de 8 cm⁻¹ pour chaque échantillon. Les interférogrammes ont été additionnés pour augmenter le ratio signal sur bruit.

vi. Microscopie électronique

La partie supérieure d'hypocotyle de plantules étiolées de 4 jours ont été prélevées puis transférées dans une coupelle contenant du 1-hexadécane (Sigma, 52 276) puis immédiatement cyofixé sous haute pression (EMPACT 2, Leica). Les échantillons ont ensuite été post-fixés au tetroxide d'osmium 2% dans l'acétone. Après une remontée en température contrôlée par l'AFS2 (Leica), les échantillons ont été imprégnés d'Epon (Agar, Low Viscosity Premix Kit) puis la résine est polymérisée à 60°C pendant 16 h. Les blocs de résine contenant les échantillons ont été coupés en sections ultrafines de 80 nm à l'ultramicrotome (Leica EM UC6). Les coupes ont ensuite été contrastées à l'acétate d'uranyle 2% (m/v) pendant 20 minutes avant d'être contrastés une seconde fois au citrate de plomb pendant 10 minutes. Les coupes ont été observées au microscope électronique en transmission JEOL 1400 à 120kV et les images acquises avec une caméra haute résolution Orius SC1000 (Gatan).

vii. Expression transitoire

Pour la transformation et l'expression transitoire en cotylédons, les cultures d'agrobactéries sont centrifugées à 5000 g pendant 15 minutes et les culots repris dans 2 ml de 2YT. Cette solution est ensuite diluée dans du MS/2 (2,15 g de Murashige and Skoog medium, 0,59 g de MES, 5 g de sucrose, pH 5,6) additionné d'acétosyringone à 200 μ M pour obtenir une DO600nm comprise entre 1 et 2. Les plantules sont alors recouvertes de cette solution, 2 x 45 secondes de vide sont appliquées, puis la solution est ôtée. Après cela, les plantes sont remises en chambre de culture pendant 3 jours, avant l'observation.

viii. Système purifié

Pour l'observation des microtubules en système purifié, les lames et les lamelles sont préparées suivant le protocole décrit dans le tableau ci-dessous.

Acétone	30 minutes + sonication
Acétone	30 minutes + agitation horizontale 80 rpm
Ethanol 96°	15 minutes + agitation horizontale 80 rpm
H₂O mQ	10 allers-retours par lame/lamelle
KOH 1M	3 allers-retours par lame/lamelle
KOH 1M	4 cycle sonication (5 min ON 2 min OFF)
H₂O mQ	10 allers-retours par lame/lamelle
Séchage	Mini centrifugeuse
PEG-silane pour les lames PEG-silane-biotine pour les lamelles	18h, RT, agitation 80 rpm
Ethanol 96°	10 allers-retours par lame/lamelle
H₂O mQ	10 allers-retours par lame/lamelle
Séchage	Mini centrifugeuse

Une chambre est fabriquée à partir d'une lame et d'une lamelle. Deux bandes de scotch double face sont déposées de part et d'autre de la lame (dans la longueur) puis une lamelle est déposée sur le scotch de façon à délimiter une chambre de réaction. Dans chaque chambre est ensuite déposé : 30µL de Neutravidine pendant 2 minutes puis 50µL de PLL-PEG pendant 30 secondes puis 100µL de BRB/BSA 1% trois fois, puis 30 µL d'amorces pendant 5 minutes puis de nouveau 100µL de BRB/BSA 1% trois fois et enfin, 50µL de mélange de réaction. Le mélange réactionnel contient du BRB 1x, de la BSA 0.1%, du KCl 50mM, du Deoxymix, du Glucose 1mg.mL⁻¹, du DTT 4mM, du GTP 1mM, de la tubuline froide 10µM et de la tubuline verte 5µM et du méthyl-cellulose à 0.017%. Une fois le mélange réactionnel placé dans les chambre, celle-ci est scellée avec du mastic d'étanchéité pour fenêtre puis placée sur la platine du microscope chauffée à 32°C. L'observation est réalisée sur un microscope inversé (Eclipse Ti Nikon) équipé d'un objectif 60X 1.49 à immersion à huile, d'un système iLAS² TIRF system (Roper Scientific), d'une caméra Evolve 512 (EMCCD, Photometrics) et contrôlé par Metamorph (Molecular Devices). L'observation a été réalisée avec deux laser d'excitation à 491 et 561 nm.

5) Analyse d'image

a) Organisation du réseau cortical

Les images obtenues au microscope confocal rapide ont été découpées pour individualiser les cellules. Le plugin FibrilTool de imageJ (Boudaoud *et al.*, 2014) a été utilisé pour quantifier l'organisation du réseau de microtubules dans chaque cellule. La valeur d'anisotropie par cellule varie entre 0 (réseau isotrope) et 1 (réseau anisotrope).

b) Nombre de microtubules par faisceau

Les images de microscopie confocale ont été utilisées pour quantifier le nombre de microtubules par faisceaux. Les images STED ont été utilisées pour contrôler la précision de l'estimation, fondée sur le profil de fluorescence. En premier lieu les images de chaque génotype ont été incluses dans une pile d'image pour ensuite être normalisées avec la fonction d'imageJ correspondante (Process → Enhance Contrast → Normalize Histogramme). L'estimation du nombre de microtubules par faisceau a été réalisée en utilisant la macro développée durant cette thèse. La procédure est semi-automatisée et elle nécessite donc l'intervention de l'utilisateur à certain moment. Le programme soustrait à chaque image

l'écart-type du signal fluorescent pour se débarrasser du bruit électronique provenant du détecteur. Ensuite, dans la première version du programme, (Annexe 2) (utilisé pour la quantification du double mutant) une région d'intérêt (ROI) de 50x100 pixels est centrée manuellement sur un microtubule de l'image. La seconde version du programme (Annexe 3) (utilisée pour le mutant de MAP65-1) utilise l'orientation moyenne des microtubules pour tracer une droite en moyenne perpendiculaire aux fibres. La seconde dérivée du signal fluorescent permet d'identifier les microtubule le long de la droite. Des ROIs sont tracées au niveau de chaque microtubule suite à quoi l'utilisateur doit fermer les ROIs qui contiennent des microtubules mal orientés ou trop nombreux. Dans les deux version, la courbe de fluorescence de la portion de microtubule ainsi sélectionnée, tracée avec la fonction Gel Analyzer d'imageJ, permet de mesurer l'air sous la courbe. Le résultat de chaque macro est une liste d'aires. Ces aires ont ensuite été normalisées et analysées dans Excel et dans Prism (GraphPad Software). Pour chaque génotype, les aires ont été normalisées en les divisant par la plus petite d'entre elles (faisant l'hypothèse que cette aire corresponde à un microtubule isolé). De fait, ce ratio est une quantification relative du nombre de microtubule par faisceau. Les images STED ont permis de confirmer la corrélation entre l'estimation et le nombre de microtubules visibles en STED (Figure 8).

c) Instabilité dynamique des microtubules

Les films provenant de l'observation des plantules *in vivo* ont été traités par une soustraction de l'écart-type du signal puis une différence de filtres gaussiens. Pour rendre la lecture des kymographes plus simple, une soustraction d'image inspirée de Lindeboom *et al.* 2013 à été effectuée. En bref, à chaque point de temps, l'image n était soustraite à l'image n+1. Cette procédure permet de révéler les évènements de polymérisation comme des zones d'intensité positive et les évènements de dépolymérisation comme des zones d'intensité négative. Des kymographes en fausses couleurs ont permis de révéler les microtubules en rouge, la polymérisation des extrémités (+) en vert et la dépolymérisation des extrémités (6) en bleu. Les vitesses de croissance et de dépolymérisation ont été déterminées en utilisant le plugin KymoToolBox d'imageJ (F. Cordelières).

Les films obtenus en système purifié ont été analysé avec le plugin KymoToolBox d'imageJ (F. Cordelières) sans prétraitement.

d) Réorientation du réseau par l'auxine

Les images ont été réorientées pour que les cellules apparaissent horizontales. Chaque cellule a été analysée avec le plugin FibrilTool d'imageJ (Boudaoud *et al.*, 2014). L'orientation du réseau de microtubules a été utilisée pour déterminer l'organisation du réseau : transverse (70-90°), longitudinal (0-20°) ou oblique (20-70°). Les plantules ont été observées après avoir passé 0, 30 ou 60 minutes entre lame et lamelle, à la verticale, dans du milieu ½ M&S contenant 10 µM d'acide Indole-3-acétique.

e) Déviation de la racine

L'orientation de la racine a été déterminée en traçant, avec imageJ, une ligne allant du collet à la pointe de la racine sur les photos des plantules de 7 jours. La mesure de l'angle entre cette droite et la verticale a permis d'estimer la déviation de la racine.

f) Taille de la racine

La taille de la racine a été mesurée d'après les photos des plantules de 7 jours en utilisant le plugin NeuronJ d'imageJ (Meijering *et al.*, 2004). La taille des images a été calibrée d'après la règle placée à côté de chaque boîte de plantes.

6) Analyse statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec Prism (GraphPad Software) pour toutes les expériences à l'exception des données de FTIR pour lesquels le logiciel R a été employé.

a) Organisation du réseau cortical

Concernant le double mutant *eb1a-2 eb1b-3* et son contrôle (35S :GFP :TuA6), les images analysées proviennent de 2 répétitions biologiques pour l'hypocotyle et de 3 répétitions pour la racine. Ces répétitions ont permis l'analyse de 10 plantes de chaque génotype pour l'hypocotyle et de 12 plantes contrôles (35s ::GFP :TuA6) et 13 plantes double mutant pour la racine. Ces plantules ont permis l'analyse de 109 et 77 cellules d'hypocotyle pour le contrôle et le double mutant respectivement et de 132 et 112 cellules épidermiques racinaires pour le contrôle et le double mutant respectivement. La normalité des données a été estimée en utilisant les tests de Shapiro-Wilcoxon et de d'Agostino et Pearson. Alors que les deux tests ont conclu à la normalité des distributions dans le cas de l'hypocotyle, ils ont

conclu l'inverse pour la racine. Les deux séries de données ont donc été analysées en utilisant un test non paramétrique de Mann Whitney. Les différences d'anisotropie entre le contrôle (35S ::GFP :TuA6) et le double mutant sont significatives dans l'hypocotyle avec $p=0.0009$ et dans la racine avec $p<0.0001$.

Concernant le mutant *map65-1.1* et sa lignée complémentée, les images proviennent de 3 répétitions biologiques. Ces répétitions ont permis l'analyse de 9 plantes de chaque génotype soit 78 cellules complémentées et 71 cellules *map65-1.1*. La normalité des données a été estimée en utilisant les tests de Shapiro-Wilcoxon et de d'Agostino et Pearson. Les deux tests ont conclu que les données ne suivent pas une loi normale. En conséquence, les deux séries de données ont donc été analysées en utilisant un test non paramétrique de Mann Whitney. Les différences d'anisotropie entre la complémentation (35S ::GFP :TuA6) et le simple mutant sont significatives avec $p=0.0002$.

b) Désorganisation de la paroi

Pour chaque génotype un total de 20 spectres FTIR ont été acquis à partir de 5 hypocotyles provenant de 4 répétitions biologiques. Les spectres ont été corrigés et normalisés d'après Mouille *et al.*, 2003. Les nombre d'ondes pour lesquels la valeur d'absorbance est significativement différente entre les génotypes analysés ont été identifiés par un test-t de Student.

c) Nombre de microtubules par faisceau

Concernant le double mutant *eb1a-2 eb1b-3* et son contrôle (35S ::GFP :TuA6), au total 29 plantes, provenant de 3 répétitions biologiques, ont été analysées pour chaque génotype. Dans chaque plante, une cellule a été analysée. Environ 10 microtubules ont finalement été analysés dans chaque cellule pour un total de 270 et 276 aires pour le contrôle (35S ::GFP :TuA6) et le double mutant (*eb1a-2 eb1b-3* 35S ::GFP :TuA6) respectivement. Les données ne suivant pas une distribution normale d'après les tests de Shapiro-Wilcoxon et de d'Agostino et Pearson nous les avons comparées avec un test non paramétrique de Mann-Whitney. La différence est significative avec $p<0.0001$. Pour faciliter la lecture des jeux de données nous avons utilisé une représentation en fréquence de la population selon 4 classes : $1<\dots<2$, $2<\dots<3$, $3<\dots<4$, et >4 . Un test du χ^2 a été utilisé pour comparer ces distributions. La différence est significative avec $p=0,0006$.

Concernant le mutant *map65-1.1* et sa lignée complétée, 11 plantes complétées et 15 plantes mutantes ont été analysées. Ces plantes proviennent de 2 répétitions biologiques pour la lignée complétée et de 3 répétitions biologiques pour le mutant. Dans chaque plante, une cellule a été analysée. Dans chaque cellule, de 2 à 16 microtubules ont été analysés pour un total de 80 microtubules pour la lignée complétée et 78 pour le mutant. Le test de Mann-Whitney utilisé pour comparer les médianes conclu à une différence significative des médianes avec $p=0,001$. Pour faciliter la lecture des jeux de données nous avons utilisé une représentation en fréquence de la population selon 4 classes : $1 < \dots < 2$, $2 < \dots < 3$, $3 < \dots < 4$, et > 4 . Un test du Chi² a été utilisé pour comparer ces distributions. La différence est significative avec $p=0,0015$.

d) Instabilité dynamique

Concernant le double mutant *eb1a-2 eb1b-3* et sa lignée contrôle (35S ::GFP :TuA6), 8 cellules provenant de 8 plantes ont été analysées en 3 répétitions biologiques. L'analyse de ces cellules a permis de suivre 158 et 125 polymérisations, 69 et 38 dépolymérisations, 93 et 64 catastrophes, 20 et 13 sauvetages et 41 et 33 pauses dans le contrôle (35S ::GFP :TuA6) et dans le double mutant (*eb1a-2 eb1b-3* 35S ::GFP :TuA6) respectivement. Pour chaque paramètre (vitesse de polymérisation, vitesse de dépolymérisation, fréquence de catastrophe, fréquence de sauvetage) une valeur moyenne a été calculée pour chaque plante. Les huit valeurs obtenues, comparées avec un test non paramétriques de Mann-Whitney ne révèlent pas de différences significatives.

Concernant le mutant *map65-1* et sa lignée complétée, 8 cellules provenant de 8 plantes ont été analysées en 3 répétitions biologiques pour chaque génotype. L'analyse de ces cellules a permis de suivre 475 et 349 polymérisations, 189 et 182 dépolymérisations, 189 et 182 catastrophes dans la lignée complétée et *map65-1.1* respectivement. Pour chaque paramètre (vitesse de polymérisation, vitesse de dépolymérisation, fréquence de catastrophe, fréquence de sauvetage) une valeur moyenne a été calculée pour chaque plante. Les huit valeurs obtenues, comparées avec un test non paramétriques de Mann-Whitney. Le test est légèrement significatif concernant la vitesse de dépolymérisation avec $p=0,01$, la fréquence de catastrophe avec $p=0,28$ et ne révèlent pas de différence significative concernant la vitesse de polymérisation.

Les analyses en système purifié ont toutes été réalisées avec les mêmes lots de tubuline, de protéines EB1b et de protéine EB1 de souris. Les données proviennent de 2 films pour la condition tubuline seule, de 3 films pour la condition tubuline + EB1b et de 2 films pour la condition tubuline + EB1 de souris. Ces films ont permis de suivre, 40, 55 et 28 microtubules pour les conditions tubuline, tubuline + EB1b et tubuline + EB1 de souris respectivement. Ces microtubules ont permis de suivre 146, 247 et 159 évènements de polymérisation et de dépolymérisation dans les tubuline, tubuline + EB1b et tubuline + EB1 de souris respectivement. Les données ne suivent pas une loi normale d'après les tests de Shapiro-Wilcoxon et de d'Agostino et Pearson. Les paramètres de l'instabilité dynamique ont donc été comparés en utilisant un test de Kruskal-Wallis. Le test est significatif avec $p < 0,0001$.

e) Réorientation du réseau de microtubules par l'auxine

A chaque point de temps 10 plantules ont été analysées ce qui a permis d'analyser au moins 59 cellules par point de temps. Les données proviennent de 2 répétitions biologiques. Les fréquences de cellules présentant un réseau de microtubule transverse, longitudinal ou oblique ont été comparées en utilisant un test du χ^2 et les différences ne sont pas significatives.

f) Taille et déviation des racines en fonction de la dureté du milieu.

L'observation de 3 répétitions biologiques a permis de mesurer de 76 à 104 plantes pour la mesure de la taille et de 84 à 103 plantes pour la déviation. L'analyse des données par les tests de Shapiro-Wilcoxon et de d'Agostino et Pearson a révélé que les données ne suivent pas une loi normale. Les expériences ont été comparées en utilisant un test de Kruskal-Wallis. Les différences significatives sont signalées par une lettre sur le graphe.

g) Taille du méristème apical racinaire

Les données proviennent de 3 répétitions biologiques, pour un total de 17 plantes sauvages (Col-0) et de 14 plantes double mutant (*eb1a-2 eb1b-3*). La taille du méristème a été estimé en mesurant la distance entre le centre quiescent et le début de la zone d'élongation. Les différences ne sont pas significatives d'après un test de Mann-Whitney.

7) Purification de la protéine EB1b-6xHis

Les culots bactériens congelés sont re-suspendu dans 15mL de Buffer 1 puis placés 30 minutes sur glaces. Les bactéries sont ensuite lysées par sonication (12 cycles, 45 secondes ON 30 secondes OFF). 2000 unités de DNase II sont ajoutées et la solution qui est placée sur glace pendant 10 minutes. Un aliquote de la solution est prélevé et noté « Extrait ». La solution est centrifugée à 4°C, 25 000g pendant 30 minutes. Pendant la centrifugation la résine cobalt est équilibrée avec 15mL de Buffer 2. A la fin de la centrifugation des aliquotes du surnageant et du culot sont prélevés et notés « surnageant » et « culot ». Le surnageant est mis en contact, dans un tube 50mL, avec la résine sous agitation rotative à 4°C pendant 40 minutes. La résine est centrifugée à 4°C, 700g pendant 5 minutes. Le surnageant est retiré et un aliquote est prelevé et noté « Flow-Through ». 10mL de Buffer 2 sont ajoutés à la résine qui est ensuite mise à agiter à 4°C pendant 15 minutes. La résine est centrifugée à 4°C 700g pendant 5 minutes puis le surnageant est retiré, un aliquote est prélevé et noté « Lavage 1 ». 10mL de Buffer 2 sont ajoutés à la résine qui est ensuite mise à agiter à 4°C pendant 15 minutes. La résine est centrifugée à 4°C 700g pendant 5 minutes puis le surnageant est retiré, un aliquote est prélevé et noté « Lavage 2 ». ». 10mL de Buffer 2 sont ajoutés à la résine qui est ensuite mise à agiter à 4°C pendant 15 minutes. La résine est chargée dans la colonne à 4°C et le liquide est retiré par gravité. Un aliquote est prélevé et noté « Lavage 3 ». Toujours à 4°C, le tampon d'élution est jouté par fraction de 500µL. Chaque fraction récupérée en sortie de colonne est testée immédiatement en ajoutant 10µL de la fraction à 250µL de réactif de Bradford. 20 fractions sont extraites au total. Le pic de protéine semble être atteint à la fraction 11.

Le Buffer 1 contient 40mM de TRIS base + HCL, 300mM NaCl, 0,1% de Triton X-100, du lysozyme à 1mg.mL⁻¹, et des inhibiteurs de protéases (Aprotinine 10µg.mL⁻¹, Leupeptine 10µg.mL⁻¹, Pepstatine A 1µg.mL⁻¹, et PMSF 1mM) le tout à pH 7. Le Buffer 2 contient 20mM de TRIS base + HCl, 300mM de NaCl, 0,1% de Triton X-100, 10mM d'imidazole, le tout à pH 7. Le tampon d'élution contient 20mM TRIS base + HCl, 150 mM NaCl, 200mM d'imidazole, le tout à pH 7.

Les différents aliquotes prélevés au cours de la purification ainsi que les fractions éluées sont analysés par électrophorèse et par Western-Blot. Avant d'être utilisée la protéine subit une chromatographie d'exclusion dans du tampon BRB.

Bibliographie

- Akhmanova, A., et Steinmetz, M.O.** (2008). Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9, 309-322.
- Akhmanova, A., et Steinmetz, M.O.** (2010). Microtubule +TIPs at a glance. *Journal of cell science* 123, 3415-3419.
- Ambrose, J.C., et Wasteney, G.O.** (2008). CLASP modulates microtubule-cortex interaction during self-organization of acentrosomal microtubules. *Molecular biology of the cell* 19, 4730-4737.
- Anderson, C.T., Carroll, A., Akhmetova, L., et Somerville, C.** (2010). Real-time imaging of cellulose reorientation during cell wall expansion in Arabidopsis roots. *Plant physiology* 152, 787-796.
- Baskin, T.I.** (2001). On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: a review and a model. *Protoplasma* 215, 150-171.
- Beinhauer, J.D., Hagan, I.M., Hegemann, J.H., et Fleig, U.** (1997). Mal3, the fission yeast homologue of the human APC-interacting protein EB-1 is required for microtubule integrity and the maintenance of cell form. *The Journal of cell biology* 139, 717-728.
- Bermudes, D., Hinkle, G., et Margulis, L.** (1994). Do prokaryotes contain microtubules? *Microbiological reviews* 58, 387-400.
- Bieling, P., Laan, L., Schek, H., Munteanu, E.L., Sandblad, L., Dogterom, M., Brunner, D., et Surrey, T.** (2007). Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system in vitro. *Nature* 450, 1100-1105.
- Bisgrove, S.R., Lee, Y.R., Liu, B., Peters, N.T., et Kropf, D.L.** (2008). The microtubule plus-end binding protein EB1 functions in root responses to touch and gravity signals in Arabidopsis. *The Plant cell* 20, 396-410.
- Boudaoud, A., Burian, A., Borowska-Wykret, D., Uyttewaal, M., Wrzalik, R., Kwiatkowska, D., et Hamant, O.** (2014). FibrilTool, an ImageJ plug-in to quantify fibrillar structures in raw microscopy images. *Nature protocols* 9, 457-463.
- Boyer, J.C., et Haenni, A.L.** (1994). Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology* 198, 415-426.
- Bratman, S.V., et Chang, F.** (2007). Stabilization of overlapping microtubules by fission yeast CLASP. *Developmental cell* 13, 812-827.
- Bridges, A.A., Jentsch, M.S., Oakes, P.W., Occhipinti, P., et Gladfelter, A.S.** (2016). Micron-scale plasma membrane curvature is recognized by the septin cytoskeleton. *The Journal of cell biology* 213, 23-32.
- Bringmann, M., Landrein, B., Schudoma, C., Hamant, O., Hauser, M.T., et Persson, S.** (2012). Cracking the elusive alignment hypothesis: the microtubule-cellulose synthase nexus unraveled. *Trends in plant science* 17, 666-674.
- Brouhard, G.J., Stear, J.H., Noetzel, T.L., Al-Bassam, J., Kinoshita, K., Harrison, S.C., Howard, J., et Hyman, A.A.** (2008). XMAP215 is a processive microtubule polymerase. *Cell* 132, 79-88.
- Burian, A., Ludynia, M., Uyttewaal, M., Traas, J., Boudaoud, A., Hamant, O., et Kwiatkowska, D.** (2013). A correlative microscopy approach relates microtubule behaviour, local organ geometry, and cell growth at the Arabidopsis shoot apical meristem. *Journal of experimental botany* 64, 5753-5767.

- Burk, D.H., et Ye, Z.H.** (2002). Alteration of oriented deposition of cellulose microfibrils by mutation of a katanin-like microtubule-severing protein. *The Plant cell* *14*, 2145-2160.
- Cabeen, M.T., et Jacobs-Wagner, C.** (2010). The bacterial cytoskeleton. *Annual review of genetics* *44*, 365-392.
- Caceres, A., et Kosik, K.S.** (1990). Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* *343*, 461-463.
- Chan, J., Calder, G., Fox, S., et Lloyd, C.** (2007). Cortical microtubule arrays undergo rotary movements in *Arabidopsis* hypocotyl epidermal cells. *Nature cell biology* *9*, 171-175.
- Chan, J., Calder, G.M., Doonan, J.H., et Lloyd, C.W.** (2003). EB1 reveals mobile microtubule nucleation sites in *Arabidopsis*. *Nature cell biology* *5*, 967-971.
- Chan, J., Jensen, C.G., Jensen, L.C., Bush, M., et Lloyd, C.W.** (1999). The 65-kDa carrot microtubule-associated protein forms regularly arranged filamentous cross-bridges between microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 14931-14936.
- Chang-Jie, J., et Sonobe, S.** (1993). Identification and preliminary characterization of a 65 kDa higher-plant microtubule-associated protein. *Journal of cell science* *105* (Pt 4), 891-901.
- Chen, C.R., Chen, J., et Chang, E.C.** (2000). A conserved interaction between Moel and Mal3 is important for proper spindle formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular biology of the cell* *11*, 4067-4077.
- Chretien, D., Buendia, B., Fuller, S.D., et Karsenti, E.** (1997). Reconstruction of the centrosome cycle from cryoelectron micrographs. *Journal of structural biology* *120*, 117-133.
- Coquelle, F.M., Vitre, B., et Arnal, I.** (2009). Structural basis of EB1 effects on microtubule dynamics. *Biochemical Society transactions* *37*, 997-1001.
- Cullen, C.F., Deak, P., Glover, D.M., et Ohkura, H.** (1999). mini spindles: A gene encoding a conserved microtubule-associated protein required for the integrity of the mitotic spindle in *Drosophila*. *The Journal of cell biology* *146*, 1005-1018.
- Currie, J.D., Stewman, S., Schimizzi, G., Slep, K.C., Ma, A., et Rogers, S.L.** (2011). The microtubule lattice and plus-end association of *Drosophila* Mini spindles is spatially regulated to fine-tune microtubule dynamics. *Molecular biology of the cell* *22*, 4343-4361.
- DeMichele, D.W., et Sharpe, P.J.** (1973). An analysis of the mechanics of guard cell motion. *Journal of theoretical biology* *41*, 77-96.
- des Georges, A., Katsuki, M., Drummond, D.R., Osei, M., Cross, R.A., et Amos, L.A.** (2008). Mal3, the *Schizosaccharomyces pombe* homolog of EB1, changes the microtubule lattice. *Nature structural & molecular biology* *15*, 1102-1108.
- Desai, A., et Mitchison, T.J.** (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annual review of cell and developmental biology* *13*, 83-117.
- Dimitrov, A., Quesnoit, M., Moutel, S., Cantaloube, I., Pous, C., et Perez, F.** (2008). Detection of GTP-tubulin conformation in vivo reveals a role for GTP remnants in microtubule rescues. *Science* *322*, 1353-1356.
- Dixit, R., et Cyr, R.** (2004). Encounters between dynamic cortical microtubules promote ordering of the cortical array through angle-dependent modifications of microtubule behavior. *The Plant cell* *16*, 3274-3284.
- Durand-Smet, P., Chastrette, N., Guiroy, A., Richert, A., Berne-Dedieu, A., Szecsi, J., Boudaoud, A., Frachisse, J.M., Bendahmane, M., Hamant, O., et al.** (2014). A comparative mechanical analysis of plant and animal cells reveals convergence across kingdoms. *Biophysical journal* *107*, 2237-2244.

- Eisinger, W., Ehrhardt, D., et Briggs, W.** (2012a). Microtubules are essential for guard-cell function in *Vicia* and *Arabidopsis*. *Molecular plant* 5, 601-610.
- Eisinger, W.R., Kirik, V., Lewis, C., Ehrhardt, D.W., et Briggs, W.R.** (2012b). Quantitative changes in microtubule distribution correlate with guard cell function in *Arabidopsis*. *Molecular plant* 5, 716-725.
- Eren, E.C., Dixit, R., et Gautam, N.** (2010). A three-dimensional computer simulation model reveals the mechanisms for self-organization of plant cortical microtubules into oblique arrays. *Molecular biology of the cell* 21, 2674-2684.
- Eren, E.C., Gautam, N., et Dixit, R.** (2012). Computer simulation and mathematical models of the noncentrosomal plant cortical microtubule cytoskeleton. *Cytoskeleton* 69, 144-154.
- Erickson, H.P.** (1995). FtsZ, a prokaryotic homolog of tubulin? *Cell* 80, 367-370.
- Etienne-Manneville, S.** (2013). Microtubules in cell migration. *Annual review of cell and developmental biology* 29, 471-499.
- Eun, Y.J., Kapoor, M., Hussain, S., et Garner, E.C.** (2015). Bacterial Filament Systems: Toward Understanding Their Emergent Behavior and Cellular Functions. *The Journal of biological chemistry* 290, 17181-17189.
- Fodde, R., Smits, R., et Clevers, H.** (2001). APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nature reviews. Cancer* 1, 55-67.
- Franck, A., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K., et Hirth, L.** (1980). Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell* 21, 285-294.
- Franks, P.J., et Farquhar, G.D.** (2007). The mechanical diversity of stomata and its significance in gas-exchange control. *Plant physiology* 143, 78-87.
- Fu, Y.** (2015). The cytoskeleton in the pollen tube. *Current opinion in plant biology* 28, 111-119.
- Galva, C., Kirik, V., Lindeboom, J.J., Kaloriti, D., Rancour, D.M., Hussey, P.J., Bednarek, S.Y., Ehrhardt, D.W., et Sedbrook, J.C.** (2014). The microtubule plus-end tracking proteins SPR1 and EB1b interact to maintain polar cell elongation and directional organ growth in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 26, 4409-4425.
- Gard, D.L., Becker, B.E., et Josh Romney, S.** (2004). MAPPING the eukaryotic tree of life: structure, function, and evolution of the MAP215/Dis1 family of microtubule-associated proteins. *International review of cytology* 239, 179-272.
- Gard, D.L., et Kirschner, M.W.** (1987). A microtubule-associated protein from *Xenopus* eggs that specifically promotes assembly at the plus-end. *The Journal of cell biology* 105, 2203-2215.
- Gendreau, E., Traas, J., Desnos, T., Grandjean, O., Caboche, M., et Hofte, H.** (1997). Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology* 114, 295-305.
- Gimona, M., Djinovic-Carugo, K., Kranewitter, W.J., et Winder, S.J.** (2002). Functional plasticity of CH domains. *FEBS letters* 513, 98-106.
- Gittes, F., Mickey, B., Nettleton, J., et Howard, J.** (1993). Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *The Journal of cell biology* 120, 923-934.
- Gleeson, L., Squires, S., et Bisgrove, S.R.** (2012). The microtubule associated protein END BINDING 1 represses root responses to mechanical cues. *Plant science : an international journal of experimental plant biology* 187, 1-9.
- Gotlieb, A.I., May, L.M., Subrahmanyam, L., et Kalnins, V.I.** (1981). Distribution of microtubule organizing centers in migrating sheets of endothelial cells. *The Journal of cell biology* 91, 589-594.
- Grigoriev, I., Gouveia, S.M., van der Vaart, B., Demmers, J., Smyth, J.T., Honnappa, S., Splinter, D., Steinmetz, M.O., Putney, J.W., Jr., Hoogenraad, C.C., et al.** (2008).

- STIM1 is a MT-plus-end-tracking protein involved in remodeling of the ER. *Current biology : CB* 18, 177-182.
- Guesdon, A., Bazile, F., Buey, R.M., Mohan, R., Monier, S., Garcia, R.R., Angevin, M., Heichette, C., Wieneke, R., Tampe, R., et al.** (2016). EB1 interacts with outwardly curved and straight regions of the microtubule lattice. *Nature cell biology* 18, 1102-1108.
- Guinea, G.V., Rojo, F.J., et Elices, M.** (2004). Brittle failure of dry spaghetti. *Engineering Failure Analysis*.
- Gundersen, G.G., et Bulinski, J.C.** (1988). Selective stabilization of microtubules oriented toward the direction of cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 5946-5950.
- Gunning, P.W., Ghoshdastider, U., Whitaker, S., Popp, D., et Robinson, R.C.** (2015). The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments. *Journal of cell science* 128, 2009-2019.
- Hamada, T.** (2014). Lessons from in vitro reconstitution analyses of plant microtubule-associated proteins. *Frontiers in plant science* 5, 409.
- Hamada, T., Ueda, H., Kawase, T., et Hara-Nishimura, I.** (2014). Microtubules contribute to tubule elongation and anchoring of endoplasmic reticulum, resulting in high network complexity in Arabidopsis. *Plant physiology* 166, 1869-1876.
- Hamant, O., Heisler, M.G., Jonsson, H., Krupinski, P., Uyttewaal, M., Bokov, P., Corson, F., Sahlin, P., Boudaoud, A., Meyerowitz, E.M., et al.** (2008). Developmental patterning by mechanical signals in Arabidopsis. *Science* 322, 1650-1655.
- Hashimoto, T.** (2013). Dissecting the cellular functions of plant microtubules using mutant tubulins. *Cytoskeleton* 70, 191-200.
- Hervieux, N., Dumond, M., Sapala, A., Routier-Kierzkowska, A.L., Kierzkowski, D., Roeder, A.H., Smith, R.S., Boudaoud, A., et Hamant, O.** (2016). A Mechanical Feedback Restricts Sepal Growth and Shape in Arabidopsis. *Current biology : CB*.
- Holy, T.E., et Leibler, S.** (1994). Dynamic instability of microtubules as an efficient way to search in space. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 5682-5685.
- Howard, J., et Hyman, A.A.** (2007). Microtubule polymerases and depolymerases. *Current opinion in cell biology* 19, 31-35.
- Howell, B., Larsson, N., Gullberg, M., et Cassimeris, L.** (1999). Dissociation of the tubulin-sequestering and microtubule catastrophe-promoting activities of oncoprotein 18/stathmin. *Molecular biology of the cell* 10, 105-118.
- Hunyadi, V., Chretien, D., et Janosi, I.M.** (2005). Mechanical stress induced mechanism of microtubule catastrophes. *Journal of molecular biology* 348, 927-938.
- Hussey, P.J., Hawkins, T.J., Igarashi, H., Kaloriti, D., et 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 molecular biology* 50, 915-924.
- Janson, M.E., et Dogterom, M.** (2004). A bending mode analysis for growing microtubules: evidence for a velocity-dependent rigidity. *Biophysical journal* 87, 2723-2736.
- Kaplan, K.B., Burds, A.A., Swedlow, J.R., Bekir, S.S., Sorger, P.K., et Nathke, I.S.** (2001). A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. *Nature cell biology* 3, 429-432.
- Kawamura, E., Himmelpach, R., Rashbrooke, M.C., Whittington, A.T., Gale, K.R., Collings, D.A., et Wasteneys, G.O.** (2006). MICROTUBULE ORGANIZATION 1 regulates structure and function of microtubule arrays during mitosis and cytokinesis in the Arabidopsis root. *Plant physiology* 140, 102-114.

- Kawamura, E., et Wasteneys, G.O.** (2008). MOR1, the Arabidopsis thaliana homologue of Xenopus MAP215, promotes rapid growth and shrinkage, and suppresses the pausing of microtubules in vivo. *Journal of cell science* *121*, 4114-4123.
- Kim, H., Binder, L.I., et Rosenbaum, J.L.** (1979). The periodic association of MAP2 with brain microtubules in vitro. *The Journal of cell biology* *80*, 266-276.
- Kinoshita, M., Field, C.M., Coughlin, M.L., Straight, A.F., et Mitchison, T.J.** (2002). Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins. *Developmental cell* *3*, 791-802.
- Kirschner, M., et Mitchison, T.** (1986). Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell* *45*, 329-342.
- Knops, J., Kosik, K.S., Lee, G., Pardee, J.D., Cohen-Gould, L., et McConlogue, L.** (1991). Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes. *The Journal of cell biology* *114*, 725-733.
- Komaki, S., Abe, T., Coutuer, S., Inze, D., Russinova, E., et Hashimoto, T.** (2010). Nuclear-localized subtype of end-binding 1 protein regulates spindle organization in Arabidopsis. *Journal of cell science* *123*, 451-459.
- Komis, G., Mistrik, M., Samajova, O., Dostkocilova, A., Ovecka, M., Illes, P., Bartek, J., et Samaj, J.** (2014). Dynamics and organization of cortical microtubules as revealed by superresolution structured illumination microscopy. *Plant physiology* *165*, 129-148.
- Kopczak, S.D., Haas, N.A., Hussey, P.J., Silflow, C.D., et Snustad, D.P.** (1992). The small genome of Arabidopsis contains at least six expressed alpha-tubulin genes. *The Plant cell* *4*, 539-547.
- Korenbaum, E., et Rivero, F.** (2002). Calponin homology domains at a glance. *Journal of cell science* *115*, 3543-3545.
- Kosetsu, K., Matsunaga, S., Nakagami, H., Colcombet, J., Sasabe, M., Soyano, T., Takahashi, Y., Hirt, H., et Machida, Y.** (2010). The MAP kinase MPK4 is required for cytokinesis in Arabidopsis thaliana. *The Plant cell* *22*, 3778-3790.
- Ledbetter, M.C., et Porter, K.R.** (1963). A "Microtubule" in Plant Cell Fine Structure. *The Journal of cell biology* *19*, 239-250.
- Leitz, G., Kang, B.H., Schoenwaelder, M.E., et Staehelin, L.A.** (2009). Statolith sedimentation kinetics and force transduction to the cortical endoplasmic reticulum in gravity-sensing Arabidopsis columella cells. *The Plant cell* *21*, 843-860.
- Liesche, J., Ziomkiewicz, I., et Schulz, A.** (2013). Super-resolution imaging with Pontamine Fast Scarlet 4BS enables direct visualization of cellulose orientation and cell connection architecture in onion epidermis cells. *BMC plant biology* *13*, 226.
- Ligon, L.A., Shelly, S.S., Tokito, M.K., et Holzbaur, E.L.** (2006). Microtubule binding proteins CLIP-170, EB1, and p150Glued form distinct plus-end complexes. *FEBS letters* *580*, 1327-1332.
- Lindeboom, J.J., Nakamura, M., Hibbel, A., Shundyak, K., Gutierrez, R., Ketelaar, T., Emons, A.M., Mulder, B.M., Kirik, V., et Ehrhardt, D.W.** (2013). A mechanism for reorientation of cortical microtubule arrays driven by microtubule severing. *Science* *342*, 1245-1253.
- Louie, R.K., Bahmanyar, S., Siemers, K.A., Votin, V., Chang, P., Stearns, T., Nelson, W.J., et Barth, A.I.** (2004). Adenomatous polyposis coli and EB1 localize in close proximity of the mother centriole and EB1 is a functional component of centrosomes. *Journal of cell science* *117*, 1117-1128.
- Lovestone, S., Hartley, C.L., Pearce, J., et Anderton, B.H.** (1996). Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3 beta in intact mammalian cells: the effects on the organization and stability of microtubules. *Neuroscience* *73*, 1145-1157.

- Lowe, J., et Amos, L.A.** (1998). Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* *391*, 203-206.
- Lucas, J.R., Courtney, S., Hassfurder, M., Dhingra, S., Bryant, A., et Shaw, S.L.** (2011). Microtubule-associated proteins MAP65-1 and MAP65-2 positively regulate axial cell growth in etiolated *Arabidopsis* hypocotyls. *The Plant cell* *23*, 1889-1903.
- Mandelkow, E.M., et Mandelkow, E.** (1985). Unstained microtubules studied by cryo-electron microscopy. Substructure, supertwist and disassembly. *Journal of molecular biology* *181*, 123-135.
- Marc, J., Granger, C.L., Brincat, J., Fisher, D.D., Kao, T., McCubbin, A.G., et Cyr, R.J.** (1998). A GFP-MAP4 reporter gene for visualizing cortical microtubule rearrangements in living epidermal cells. *The Plant cell* *10*, 1927-1940.
- Mathur, J., Mathur, N., Kernebeck, B., Srinivas, B.P., et Hulskamp, M.** (2003). A novel localization pattern for an EB1-like protein links microtubule dynamics to endomembrane organization. *Current biology : CB* *13*, 1991-1997.
- Maurer, S.P., Fourniol, F.J., Bohner, G., Moores, C.A., et Surrey, T.** (2012). EBs recognize a nucleotide-dependent structural cap at growing microtubule ends. *Cell* *149*, 371-382.
- Meijering, E., Jacob, M., Sarria, J.C., Steiner, P., Hirling, H., et Unser, M.** (2004). Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* *58*, 167-176.
- Meng, Q., Du, J., Li, J., Lu, X., Zeng, X., Yuan, M., et Mao, T.** (2010). Tobacco microtubule-associated protein, MAP65-1c, bundles and stabilizes microtubules. *Plant molecular biology* *74*, 537-547.
- Migliaccio, F., Tassone, P., et Fortunati, A.** (2013). Circumnutation as an autonomous root movement in plants. *American journal of botany* *100*, 4-13.
- Miller, R.K., Cheng, S.C., et Rose, M.D.** (2000). Bim1p/Yeb1p mediates the Kar9p-dependent cortical attachment of cytoplasmic microtubules. *Molecular biology of the cell* *11*, 2949-2959.
- Mimori-Kiyosue, Y., Grigoriev, I., Lansbergen, G., Sasaki, H., Matsui, C., Severin, F., Galjart, N., Grosveld, F., Vorobjev, I., Tsukita, S., et al.** (2005). CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex. *The Journal of cell biology* *168*, 141-153.
- Mitchison, T., et Kirschner, M.** (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* *312*, 237-242.
- Mohan, R., et John, A.** (2015). Microtubule-associated proteins as direct crosslinkers of actin filaments and microtubules. *IUBMB life* *67*, 395-403.
- Mollinari, C., Kleman, J.P., Jiang, W., Schoehn, G., Hunter, T., et Margolis, R.L.** (2002). PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone. *The Journal of cell biology* *157*, 1175-1186.
- Moon, W., et Hazelrigg, T.** (2004). The *Drosophila* microtubule-associated protein mini spindles is required for cytoplasmic microtubules in oogenesis. *Current biology : CB* *14*, 1957-1961.
- Moores, C.A., Perderiset, M., Kappeler, C., Kain, S., Drummond, D., Perkins, S.J., Chelly, J., Cross, R., Houdusse, A., et Francis, F.** (2006). Distinct roles of doublecortin modulating the microtubule cytoskeleton. *The EMBO journal* *25*, 4448-4457.
- Moring, S., Ruscha, M., Cooke, P., et Samson, F.** (1975). Isolation and polymerization of brain actin. *Journal of neurobiology* *6*, 245-255.

- Morrison, E.E., Moncur, P.M., et Askham, J.M.** (2002). EB1 identifies sites of microtubule polymerisation during neurite development. *Brain research. Molecular brain research* 98, 145-152.
- Mostowy, S., et Cossart, P.** (2012). Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nature reviews. Molecular cell biology* 13, 183-194.
- Mostowy, S., Janel, S., Forestier, C., Roudit, C., Kasas, S., Pizarro-Cerda, J., Cossart, P., et Lafont, F.** (2011). A role for septins in the interaction between the *Listeria monocytogenes* INVASION PROTEIN InlB and the Met receptor. *Biophysical journal* 100, 1949-1959.
- Mucke, N., Kreplak, L., Kirmse, R., Wedig, T., Herrmann, H., Aebi, U., et Langowski, J.** (2004). Assessing the flexibility of intermediate filaments by atomic force microscopy. *Journal of molecular biology* 335, 1241-1250.
- Nick, P.** (2013). Microtubules, signalling and abiotic stress. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 75, 309-323.
- Olson, K.R., McIntosh, J.R., et Olmsted, J.B.** (1995). Analysis of MAP 4 function in living cells using green fluorescent protein (GFP) chimeras. *The Journal of cell biology* 130, 639-650.
- Ortiz, C., Natale, P., Cueto, L., et Vicente, M.** (2016). The keepers of the ring: regulators of FtsZ assembly. *FEMS microbiology reviews* 40, 57-67.
- Pedersen, L.B., Geimer, S., Sloboda, R.D., et Rosenbaum, J.L.** (2003). The Microtubule plus end-tracking protein EB1 is localized to the flagellar tip and basal bodies in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current biology : CB* 13, 1969-1974.
- Perrin, B.J., et Ervasti, J.M.** (2010). The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton* 67, 630-634.
- Pilhofer, M., Ladinsky, M.S., McDowall, A.W., Petroni, G., et Jensen, G.J.** (2011). Microtubules in bacteria: Ancient tubulins build a five-protofilament homolog of the eukaryotic cytoskeleton. *PLoS biology* 9, e1001213.
- Ponstingl, H., Krauhs, E., Little, M., et Kempf, T.** (1981). Complete amino acid sequence of alpha-tubulin from porcine brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 2757-2761.
- Portran, D., Zoccoler, M., Gaillard, J., Stoppin-Mellet, V., Neumann, E., Arnal, I., Martiel, J.L., et Vantard, M.** (2013). MAP65/Ase1 promote microtubule flexibility. *Molecular biology of the cell* 24, 1964-1973.
- Putnam, A.J., Cunningham, J.J., Dennis, R.G., Linderman, J.J., et Mooney, D.J.** (1998). Microtubule assembly is regulated by externally applied strain in cultured smooth muscle cells. *Journal of cell science* 111 (Pt 22), 3379-3387.
- Rehberg, M., et Graf, R.** (2002). Dictyostelium EB1 is a genuine centrosomal component required for proper spindle formation. *Molecular biology of the cell* 13, 2301-2310.
- Reilein, A.R., Serpinskaya, A.S., Karcher, R.L., Dujardin, D.L., Vallee, R.B., et Gelfand, V.I.** (2003). Differential regulation of dynein-driven melanosome movement. *Biochemical and biophysical research communications* 309, 652-658.
- Rodionov, V.I., Gyoeva, F.K., et Gelfand, V.I.** (1991). Kinesin is responsible for centrifugal movement of pigment granules in melanophores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 4956-4960.
- Rogers, G.C., Rusan, N.M., Peifer, M., et Rogers, S.L.** (2008). A multicomponent assembly pathway contributes to the formation of acentrosomal microtubule arrays in interphase *Drosophila* cells. *Molecular biology of the cell* 19, 3163-3178.

- Rogers, S.L., Rogers, G.C., Sharp, D.J., et Vale, R.D.** (2002). Drosophila EB1 is important for proper assembly, dynamics, and positioning of the mitotic spindle. *The Journal of cell biology* *158*, 873-884.
- Sang, H., Lu, Z., Li, Y., Ru, B., Wang, W., et Chen, J.** (2001). Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase 3beta in intact mammalian cells influences the stability of microtubules. *Neuroscience letters* *312*, 141-144.
- Schuyler, S.C., Liu, J.Y., et Pellman, D.** (2003). The molecular function of Ase1p: evidence for a MAP-dependent midzone-specific spindle matrix. *Microtubule-associated proteins. The Journal of cell biology* *160*, 517-528.
- Schuyler, S.C., et Pellman, D.** (2001). Microtubule "plus-end-tracking proteins": The end is just the beginning. *Cell* *105*, 421-424.
- Schwartz, K., Richards, K., et Botstein, D.** (1997). BIM1 encodes a microtubule-binding protein in yeast. *Molecular biology of the cell* *8*, 2677-2691.
- Scott, C.W., Klika, A.B., Lo, M.M., Norris, T.E., et Caputo, C.B.** (1992). Tau protein induces bundling of microtubules in vitro: comparison of different tau isoforms and a tau protein fragment. *Journal of neuroscience research* *33*, 19-29.
- Shaw, S.L., et Lucas, J.** (2011). Intrabundle microtubule dynamics in the Arabidopsis cortical array. *Cytoskeleton* *68*, 56-67.
- Sieberer, B.J., Ketelaar, T., Esseling, J.J., et Emons, A.M.** (2005). Microtubules guide root hair tip growth. *The New phytologist* *167*, 711-719.
- Smertenko, A., Saleh, N., Igarashi, H., Mori, H., Hauser-Hahn, I., Jiang, C.J., Sonobe, S., Lloyd, C.W., et Hussey, P.J.** (2000). A new class of microtubule-associated proteins in plants. *Nature cell biology* *2*, 750-753.
- Smertenko, A.P., Chang, H.Y., Wagner, V., Kaloriti, D., Fenyk, S., Sonobe, S., Lloyd, C., Hauser, M.T., et Hussey, P.J.** (2004). The Arabidopsis microtubule-associated protein AtMAP65-1: molecular analysis of its microtubule bundling activity. *The Plant cell* *16*, 2035-2047.
- Snustad, D.P., Haas, N.A., Kopczak, S.D., et Silflow, C.D.** (1992). The small genome of Arabidopsis contains at least nine expressed beta-tubulin genes. *The Plant cell* *4*, 549-556.
- Sotiriou, P., Giannoutsou, E., Panteris, E., Apostolakos, P., et Galatis, B.** (2016). Cell wall matrix polysaccharide distribution and cortical microtubule organization: two factors controlling mesophyll cell morphogenesis in land plants. *Annals of botany* *117*, 401-419.
- Steinmetz, M.O., et Akhmanova, A.** (2008). Capturing protein tails by CAP-Gly domains. *Trends in biochemical sciences* *33*, 535-545.
- Stoppin-Mellet, V., Fache, V., Portran, D., Martiel, J.L., et Vantard, M.** (2013). MAP65 coordinate microtubule growth during bundle formation. *PloS one* *8*, e56808.
- Stoppin-Mellet, V., Gaillard, J., et Vantard, M.** (2002). Functional evidence for in vitro microtubule severing by the plant katanin homologue. *The Biochemical journal* *365*, 337-342.
- Su, L.K., Burrell, M., Hill, D.E., Gyuris, J., Brent, R., Wiltshire, R., Trent, J., Vogelstein, B., et Kinzler, K.W.** (1995). APC binds to the novel protein EB1. *Cancer research* *55*, 2972-2977.
- Tanaka-Takiguchi, Y., Kinoshita, M., et Takiguchi, K.** (2009). Septin-mediated uniform bracing of phospholipid membranes. *Current biology : CB* *19*, 140-145.
- Tirnauer, J.S., et Bierer, B.E.** (2000). EB1 proteins regulate microtubule dynamics, cell polarity, and chromosome stability. *The Journal of cell biology* *149*, 761-766.
- Tirnauer, J.S., O'Toole, E., Berrueta, L., Bierer, B.E., et Pellman, D.** (1999). Yeast Bim1p promotes the G1-specific dynamics of microtubules. *The Journal of cell biology* *145*, 993-1007.

- Trogden, K.P., et Rogers, S.L.** (2015). TOG Proteins Are Spatially Regulated by Rac-GSK3beta to Control Interphase Microtubule Dynamics. *PloS one* *10*, e0138966.
- Ueda, K., Matsuyama, T., et Hashimoto, H.** (1999). Visualization of microtubules in living cells of transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma*.
- Van Damme, D., Van Poucke, K., Boutant, E., Ritzenthaler, C., Inze, D., et Geelen, D.** (2004). In vivo dynamics and differential microtubule-binding activities of MAP65 proteins. *Plant physiology* *136*, 3956-3967.
- Vikstrom, K.L., Lim, S.S., Goldman, R.D., et Borisy, G.G.** (1992). Steady state dynamics of intermediate filament networks. *The Journal of cell biology* *118*, 121-129.
- Vitre, B., Coquelle, F.M., Heichette, C., Garnier, C., Chretien, D., et Arnal, I.** (2008). EB1 regulates microtubule dynamics and tubulin sheet closure in vitro. *Nature cell biology* *10*, 415-421.
- Walczak, C.E.** (2000). Microtubule dynamics and tubulin interacting proteins. *Current opinion in cell biology* *12*, 52-56.
- Wasteneys, G., et Williamson, E.** (1989). Reassembly of microtubules in *Nitella tasmanica*: assembly of cortical microtubules in branching clusters and its relevance to steady-state microtubule assembly. *Journal of cell science*.
- Wasteneys, G.O.** (2002). Microtubule organization in the green kingdom: chaos or self-order? *Journal of cell science* *115*, 1345-1354.
- Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y., et Kirschner, M.W.** (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *72*, 1858-1862.
- Weinstein, B., et Solomon, F.** (1990). Phenotypic consequences of tubulin overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*: differences between alpha-tubulin and beta-tubulin. *Molecular and cellular biology* *10*, 5295-5304.
- Wen, Y., Eng, C.H., Schmoranzer, J., Cabrera-Poch, N., Morris, E.J., Chen, M., Wallar, B.J., Alberts, A.S., et Gundersen, G.G.** (2004). EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nature cell biology* *6*, 820-830.
- Whittington, A.T., Vugrek, O., Wei, K.J., Hasenbein, N.G., Sugimoto, K., Rashbrooke, M.C., et Wasteneys, G.O.** (2001). MOR1 is essential for organizing cortical microtubules in plants. *Nature* *411*, 610-613.
- Yamazaki, T., Owari, S., Ota, S., Sumiya, N., Yamamoto, M., Watanabe, K., Nagumo, T., Miyamura, S., et Kawano, S.** (2013). Localization and evolution of septins in algae. *The Plant journal : for cell and molecular biology* *74*, 605-614.
- Zhang, Q., Lin, F., Mao, T., Nie, J., Yan, M., Yuan, M., et Zhang, W.** (2012). Phosphatidic acid regulates microtubule organization by interacting with MAP65-1 in response to salt stress in *Arabidopsis*. *The Plant cell* *24*, 4555-4576.
- Zhang, R., Alushin, G.M., Brown, A., et Nogales, E.** (2015). Mechanistic Origin of Microtubule Dynamic Instability and Its Modulation by EB Proteins. *Cell* *162*, 849-859.
- Zheng, J., Buxbaum, R.E., et Heidemann, S.R.** (1993). Investigation of microtubule assembly and organization accompanying tension-induced neurite initiation. *Journal of cell science* *104* (Pt 4), 1239-1250.

Liste des annexes

Annexe 1 : Manuscrit soumis pour publication

Annexe 2 : Script ImageJ « Estimation du nombre de microtubule par faisceau V1 »

Annexe 3 : Script ImageJ « Estimation du nombre de microtubule par faisceau V2 »

Annexe 4 : Script ImageJ « Soustraction des images consécutives »

Annexe 5 : Prédiction de l'interaction entre EB1 b et MAP65-1 d'après ANAP

Annexe 1 : Manuscrit soumis à « Journal of Cell Science »

EB1 Links Microtubule Bundling and Organization to Touch Sensing in *Arabidopsis thaliana* Roots

Arthur T. Molines¹, Jessica Marion¹, Salem Chabout², Laetitia Besse³, Jim P. Dompierre^{3†},
Grégory Mouille² and Frédéric M. Coquelle^{1*}

¹Department of Cell Biology, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91198, Gif-sur-Yvette Cedex, France.

²Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB), INRA - AgroParisTech, 78026 Versailles Cedex, France.

³Light Microcopy Facility, Imagerie-Gif, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91198, Gif-sur-Yvette Cedex, France.

[†]Present address: Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, CNRS – Université de Bordeaux, 33077 Bordeaux, France

*Corresponding author: Frédéric M. Coquelle

(Tel.: +33 (0) 1 69 82 46 55 ; E-mail: frederic.coquelle@i2bc.paris-saclay.fr)

Running title: EB1 Links Microtubules to Touch Sensing in *A. thaliana*

Keywords: Microtubule, +TIPs (plus-End-Tracking Proteins), EB1 (End Binding Protein 1), Microtubule bundling, Touch response.

Abstract

Microtubules are involved in plant development and adaptation to their environment, but the sustaining molecular mechanisms remain elusive. Microtubule-End-Binding 1 (EB1) proteins participate in directional root growth in *Arabidopsis thaliana*. However, a connection to the underlying microtubule array has not been established yet. We show here that EB1 proteins contribute to the organization of cortical microtubules in growing epidermal plant cells, without strongly modulating microtubule dynamics. Using super-resolution STED microscopy, we also demonstrate a significant reduction of the microtubule bundling activity in cytoplasmic-EB1-deficient plants, suggesting a role of those proteins in microtubule nucleation or zippering. Furthermore, we observed root growth defects along with a hypersensitivity to medium hardness in EB1-deficient plants, indicating a link between microtubule array architecture and mechanical sensing. Altogether, our results support a model that EB1 proteins contribute to the balance between thigmotropism and gravitropism, through the maintenance of the microtubule network organization.

Introduction

The tightly controlled cell expansion is crucial for plant development and adaptation to environmental conditions. Increasing number of evidences suggest that the microtubule (MT) cytoskeleton plays a major role in this process (Andreeva *et al.*, 2010; Anthony and Hussey, 1999; Bisgrove *et al.*, 2008; Hamada, 2014; Ishida *et al.*, 2007; Sedbrook *et al.*, 2004).

In most interphase plant cells, devoid of centrosome, MTs are mostly organized in a parallel manner at the cell cortex, beneath the plasma membrane (Ledbetter and Porter, 1963). During cell expansion in roots and etiolated hypocotyls, cortical MTs are oriented transversely to the elongating axis (Granger and Cyr, 2001; Lloyd *et al.*, 1985; Sugimoto *et al.*, 2000). This particular organization allows them to contribute to the cell wall architecture by ensuring the guidance of cellulose synthase complexes as they synthesize cellulose microfibrils (Baskin, 2001; Crowell *et al.*, 2009; Fujita *et al.*, 2011; Gutierrez *et al.*, 2009; Paredez *et al.*, 2006). Hence, MTs are thought to sustain the assembly of cell wall with anisotropic mechanical properties that favor cell elongation rather than widening.

Cortical MTs are assembled in bundles of variable number of units (Ledbetter and Porter, 1963), which may be critical for the maintenance of the overall MT network architecture in plant cells (Smertenko *et al.*, 2004). In spite of these early observations, the mechanisms of bundle formation are not yet well understood, but they should imply a reduction of the remarkable MT flexural rigidity (Gittes *et al.*, 1993), mediated by associated factors such as MAP65-1/Ase1 (Portran *et al.*, 2013). Besides, MT bundles may contribute to the cell mechanical properties, being more resistant to flexion and probably to compression than isolated MT *per se* (Portran *et al.*, 2013). Conversely, MT bundles might be a part of a mechanical stress signaling process within the cell, but this remains to be demonstrated (Landrein and Hamant, 2013).

Though the MT network looks tightly organized in plant cells, it remains highly dynamic, a remarkable behavior that allow MTs to change their 3D organization in response to environmental cues or cellular requirements (Lindeboom *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013). Dynamic instability is an intrinsic property of MT (Mitchison and Kirschner, 1984), which is finely tuned within cells by a myriad of MT-Associated Proteins (MAPs) (Amos and Schlieper, 2005; Hamada, 2014). Among conserved MAPs between animal, fungi and plant kingdoms, plus-end-Tracking Proteins (+TIPs) play a central role. +TIPs accumulate at growing MT plus-ends where they contribute to MT dynamics, polarization and functions (Akhmanova and Steinmetz, 2008; Akhmanova and Steinmetz, 2010).

EB1 (End-Binding 1) is a founding member of +TIPs (Morrison, 2007; Schuyler and Pellman, 2001). In animals and yeasts, EB1 modulates MT dynamicity (Akhmanova and Steinmetz, 2008; Coquelle *et al.*, 2009; Galjart, 2010). It also mediates interaction with the cell cortex and kinetochores, thus contributing to the shaping of MT arrays in both interphase and mitosis (Lee *et al.*, 2000; Rogers *et al.*, 2002; Tirnauer *et al.*, 2002; Wen *et al.*, 2004). *In vitro* experiments showed that mammalian EB1 controls MT lattice architecture and stimulates spontaneous nucleation at high concentration, which may have a functional relationship with the MT dynamic behavior and further MT arrays formation (Vitre *et al.*, 2008). Three EB1 orthologs have been identified in *A. thaliana* and other related plants (Bisgrove *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2003; Gardiner and Marc, 2003; Komaki *et al.*, 2010; Mathur *et al.*, 2003; Meagher and Fechheimer, 2003). AtEB1 proteins are very similar to each other and to animal EB1 counterparts except divergent C-termini, suggesting specific plant properties (Dixit *et al.*, 2006; Komaki *et al.*, 2010). AtEB1a and AtEB1b are cytoplasmic and localize to the growing MT plus-ends (Abe and Hashimoto, 2005; Chan *et al.*, 2003; Dhonukshe *et al.*, 2005; Dixit *et al.*, 2006; Mathur *et al.*, 2003; Van Damme *et al.*, 2004), whereas AtEB1c is confined into the nucleus and seems to play a role in mitotic-spindle

assembly and positioning (Komaki *et al.*, 2010). AtEB1b contributes slightly to MT dynamicity in Columbia-0 ecotype (Col-0), since the *Arabidopsis eb1b-2* T-DNA insertional mutant displays reduced rescue and catastrophe frequencies without significant alteration of the growth and shrinking rates (Galva *et al.*, 2014). Despite this moderate contribution of AtEB1b to the regulation of MT dynamics, the cortical-MT network, in both root and etiolated hypocotyl cells, seems to be unaffected in AtEB1 mutants, regardless of the ecotype (Bisgrove *et al.*, 2008; Galva *et al.*, 2014; Gleeson *et al.*, 2012; Komaki *et al.*, 2010). However, root growth is altered in AtEB1b mutants of Wassilewskija ecotype (Ws) (Bisgrove *et al.*, 2008; Gleeson *et al.*, 2012) and, to a lesser extent, of Col-0 (Bisgrove *et al.*, 2008; Galva *et al.*, 2014), which questions the involvement of MTs in cell expansion and organ growth and morphogenesis in plants mentioned before.

In the present study, we performed a thorough analysis of the cortical-MT network, in both root and etiolated hypocotyl cells, of a cytoplasmic-EB1-deficient Col-0 plant line, based on a T-DNA insertion in *EB1a* exon 7 and a point mutation in *EB1b* exon 4 (*eb1a-2 eb1b-3*) (Komaki *et al.*, 2010) (see Supplementary Table 1).

We show here a moderate but significant disorganization of the cortical MT network in elongating AtEB1 double-mutant cells. This phenotype is accompanied by a reduced MT bundling activity and a modified cell wall architecture, but it is not associated with a significant change in microtubule dynamicity. In addition, plants lacking functional cytoplasmic-EB1 proteins display root skewing, as shown before for other AtEB1 mutant alleles (Bisgrove *et al.*, 2008; Galva *et al.*, 2014; Gleeson *et al.*, 2012), and a hypersensitivity to mechanical cues. Altogether, our data support the model that AtEB1a and AtEB1b contribute to the balance between thigmotropism (touch response) and gravitropism, as suggested before (Bisgrove *et al.*, 2008; Gleeson *et al.*, 2012), through the maintenance of the MT network organization.

Results

AtEB1a and AtEB1b contribute to the microtubule network architecture

Growth defects have been reported for *AtEB1a/b* mutant *Arabidopsis thaliana* plants, without a clear detailed analysis of the sustaining cortical-microtubule (MT) network (Bisgrove *et al.*, 2008; Gleeson *et al.*, 2012). To investigate the role of AtEB1a and AtEB1b in the organization of cortical MTs, epidermal elongating cells expressing 35S::GFP::TuA6 (Komaki *et al.*, 2010) to label cortical MTs, were observed alive by spinning-disk confocal microscopy. In the upper etiolated hypocotyl and in the elongation zone of root tip, cells grow rapidly, usually displaying a typical transverse array of parallel MTs (Fig. 1A and D) (Granger and Cyr, 2001; Lloyd *et al.*, 1985; Sugimoto *et al.*, 2000). However, in *eb1a-2 eb1b-3* double-mutant plants, the MT network appears partially disorganized with less parallel fibers (Fig. 1B and E). To quantify this phenomenon, we compared the average anisotropy value of cortical MT arrays between the *eb1a-2 eb1b-3* double mutant and the control (both expressing GFP::TuA6), using the ImageJ Plug-in FibrilTool (Boudaoud *et al.*, 2014). Anisotropy measurement allows us to evaluate the disorder, which may vary from 0 to 1. A value of 1 indicates a perfectly ordered network with parallel fibers, which never happens with biological samples, and a value of 0 indicates a totally disorganized (isotropic) array. In control plants, we obtained an average anisotropy of 0.20 ± 0.08 in hypocotyls and of 0.15 ± 0.05 in roots (mean \pm SD) compared to 0.16 ± 0.07 and 0.11 ± 0.05 respectively in the double mutant (Fig. 1C and F respectively). The differences are statistically significant according to a Mann-Whitney t-test with $\alpha=0.01$ and were confirmed by a frequency distribution analysis of cells according to their anisotropy value (Supplementary Fig. 1). These results indicate that the cortical MT network is partially disorganized in growing cells of plants lacking functional cytoplasmic-AtEB1 proteins.

Cortical MTs guide the movement of cellulose synthase complexes within the plasma membrane, determining the quasicrystal organization of cellulose microfibrils in the cell wall (Baskin, 2001; Crowell *et al.*, 2009; Fujita *et al.*, 2011; Green, 1962; Gutierrez *et al.*, 2009; Paredez *et al.*, 2006). Thus, the disorganization of the cortical MT network in *eb1a-2 eb1b-3* double-mutant seedlings should come with an alteration of the cell wall architecture. To verify the cell wall integrity in *eb1a-2 eb1b-3* genotype, we performed Fourier-Transform InfraRed Spectroscopy (FT-IR) on the growing upper part of hypocotyls. Spectra comparison between wild type Col-0 and double-mutant plants (both devoid of GFP::TuA6) reveals a significant difference at 990 cm^{-1} , a characteristic feature of cellulose microfibrils 3D arrangement in the primary wall (Fig. 1G) (McCann *et al.*, 1992; Mouille *et al.*, 2003). Thus, impairing cytoplasmic AtEB1 perturbs cell wall architecture, which is consistent with the cortical MT network disorganization in sustaining growing epidermal cells. Though the cell wall difference is even more pronounced in the middle of the hypocotyl compared to the upper part, it almost disappears at the bottom suggesting partial compensation and/or correction mechanisms, which may account for the mild effect of EB1 mutations at the whole-plant level (Supplementary Fig. 2) (Bisgrove *et al.*, 2008; Galva *et al.*, 2014; Gleeson *et al.*, 2012). It is worth noting that the cell wall of single *eb1a2* or *eb1b-3* mutant seedlings remains similar to Col-0 at 990 cm^{-1} , suggesting a redundancy between both cytoplasmic-EB1 representatives in *A. thaliana* (Fig. 1G).

To further explore MT arrays in the *eb1a-2 eb1b-3* double-mutant plants, we used Stimulated-Emission-Depletion (STED) microscopy to achieve super resolution imaging (Neupane *et al.*, 2014). Previous studies showed that cortical MTs are assembled as bundles through tight lateral association (Ledbetter and Porter, 1963). This particular structure is frequent in nature and is believed to contribute to the overall MT array organization (Bratman and Chang, 2007; Smertenko *et al.*, 2004). Unfortunately, the resolution limit of classical light

microscopy does not allow us to distinguish individual MTs from bundles. Yet, STED microscopy, which improves the spatial resolution about 5 times (Neupane et al., 2014), allowed us to do so to a certain extent (Fig. 2). Careful analysis of bundles in both genotypes by comparing confocal (Fig. 2C and E) to STED acquisitions (Fig. 2D and F) revealed an apparent reduction of the average number of MTs per bundle in *eb1a-2 eb1b-3* double-mutant plants, compared to control. To quantify the bundling in both genotypes, we measured, on classical confocal images, the fluorescence profile across bundles as an indicator of the number of MTs. Indeed, as shown in Figure 2A, the area under the fluorescence profile is proportional to the number of MTs in the track. If we make the hypothesis that the smallest area encountered in each condition corresponds to a single isolated MT (reference area), one can estimate the number of MTs per bundle by dividing the area under the fluorescent profile of each bundle by the reference area. The procedure was partly automatized with an ImageJ Macro that we designed (see Supplementary Fig. 4 and see materials and Methods for more details about the procedure). Compared to control, we noticed a significant reduction of the percentage of tracks with more than 2 MTs in *eb1a-2 eb1b-3* double mutant (Fig. 2B). On the average, one third of tracks have more than 2 MTs in control cells (35.64%). This proportion drops to one fifth in double-mutant cells (20.83%). In addition, the average number of MTs per track in both genotypes, though close to each other, are statistically different according to a Mann-Whitney t-test with $\alpha=0.01$ (the p-value is less than 0.0001): 2.38 ± 0.56 in control plants compared to 2.17 ± 0.51 in double mutant. These data suggest that the bundling is affected in the absence of functional cytoplasmic-AtEB1 proteins. Yet, the link between the network disorganization and the bundling failure remains to be clarified. Altogether, these sub-cellular data show that cytoplasmic-AtEB1 proteins play a role in the scaffolding and/or the maintenance of the MT network architecture.

Microtubule dynamic instability is not significantly affected in *eb1a-2 eb1b-3*

double-mutant plants

Fine-tuning of dynamic instability may account for MT array remodeling and subsequent cell polarization, morphogenesis and functions. EB1 proteins have been described in animals and yeasts as a potent regulator of MT dynamics on its own and through other interacting partners (Akhmanova and Steinmetz, 2008; Akhmanova and Steinmetz, 2010; Coquelle *et al.*, 2009; Vitre *et al.*, 2008; Wieczorek *et al.*, 2015). To investigate the role of AtEB1a and AtEB1b in the regulation of MT dynamics in *A. thaliana*, we carried out time-lapse acquisitions using Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) microscopy on hypocotyl epidermal cells, expressing GFP::TuA6, with *eb1a-2 eb1b-3* double-mutant and Col-0 backgrounds. After photobleaching an area of interest, making easier the analysis, we recorded 5 minutes movies with one image every two seconds. After thorough picture treatments (Fig. 3A and materials and methods for details), we used KymoToolBox ImageJ Plug-In to determine the parameters of dynamic instability of MT plus-end. Growing and shrinking rates did not vary between both genotypes with average values that are consistent with previous studies (Fig. 3B and Supplementary Table 2). However, catastrophe and rescue frequencies are slightly reduced in double-mutant plants compared to control, from 0.776 to 0.659 event.min⁻¹ and from 1.152 to 0.928 event.min⁻¹ respectively (Fig. 3C, detailed values in Supplementary Table 2). Though consistent with a recent publication based on a the hypomorphic *eb1b-2* mutant (Galva *et al.*, 2014), these results are not significant according to a Mann Whitney t-test, and could hardly account for the MT network disorganization and the cell wall architecture modification in EB1-deficient plants. Further confirming these results, we noticed that the MT network reorientation is still responding to high concentration of auxin in *eb1a-2 eb1b-3* double-mutant plants (Fig. 3D). Altogether, our data indicate that

AtEB1a and AtEB1b do not play crucial role in microtubule dynamic instability, unlike other eukaryotic counterparts (Coquelle *et al.*, 2009).

***eb1a-2 eb1b-3* double-mutant plants display skewed roots and altered mechanical properties**

AtEB1b hypomorphic mutant plants display roots that deviate toward the left on vertical and inclined plates (Bisgrove *et al.*, 2008). This particular behavior has been lately linked to a possible increased sensitivity to mechanical stimulation (Gleeson *et al.*, 2012).

To investigate the consequence of the *eb1a-2 eb1b-3* double loss of function mutation at the whole-plant level, we grew double-mutant plants on vertically oriented plates containing a variable concentration of agar, from 3 g.L⁻¹ to 9 g.L⁻¹, in order to modulate medium hardness (Khalid *et al.*, 1993). Double-mutant plants, expressing GFP-labeled tubulin, exhibit deviated root toward the left by an average angle of $-7.3^{\circ} \pm 5.9$ (mean \pm SD). This angle raises to $-12.4^{\circ} \pm 7.8$ on plates containing 6g.L⁻¹ of agar and to $-14.2^{\circ} \pm 7.7$ on plates containing 9g.L⁻¹ agar medium (Fig. 4A and 4C). On the contrary, control plant roots, expressing the same GFP-labeled tubulin, do not show the same hypersensitivity to the medium hardness. Indeed, control roots are oriented to the right on plates containing 3g.L⁻¹ agar-solidified medium with an average angle of $1.8^{\circ} \pm 8$. This deviation is reversed to the left on medium containing 6g.L⁻¹ and 9g.L⁻¹ with an average angle of $-2.48^{\circ} \pm 6.8$ and $-2.48^{\circ} \pm 7.2$ respectively. Hence, the double-mutant root is skewed toward the left compared to the control and this phenotype is worsened with the medium hardness. This result suggests that *eb1a-2 eb1b-3* plants are hypersensitive to mechanical cues as proposed for mutants with reduced expression of AtEB1b (Gleeson *et al.*, 2012). A weakened hardness of the MT network, due to a reduced bundling activity, in root tip cells could account for such a phenotype.

Interestingly, we noticed a significant reduction of root length in *eb1a-2 eb1b-3* mutants regardless of the medium hardness, compared to the control, suggesting a cell growth inhibition in EB1-deficient seedlings (Fig. 4B). Supporting this hypothesis, root apical meristems in *eb1a-2 eb1b-3* mutant plants are similar in size to those of control plants indicating that the phenotype is due to a cell growth defect rather than a mitotic disorder (Supplementary Fig. 4). Both skewing and shortening phenotypes are independent from the expression of 35S::GFP::TuA6, since *eb1a-2 eb1b-3* mutant plants in Col-0 background display comparable features (Fig. 5). However, in single *eb1b-3* mutant-seedlings, the negative root-skewing phenotype is associated with an increased root length, whilst single *eb1a-2* mutant does not display significant phenotype (Fig. 5). This result indicates that *eb1a* and *eb1b* are not completely redundant. The mutation of *EB1b* is sufficient to induce root skewing while it is not the case for *EB1a* simple mutant. Moreover, the double mutation of *eb1a* and *eb1b* is needed to reduce the root length. Altogether, these data indicate that both latter phenotypes, root skewing and root size, are not necessarily linked to each other.

Discussion

In non-plant eukaryotes, the disturbance of EB1 activity leads to severe phenotypes (Beinhauer *et al.*, 1997; Elliott *et al.*, 2005; Rogers *et al.*, 2002; Schwartz *et al.*, 1997). Strikingly, hypomorphic and knockout mutations in all three EB1 counterparts in *Arabidopsis thaliana* give rise to viable plants, roughly indistinguishable from control individuals (Bisgrove *et al.*, 2008; Gleeson *et al.*, 2012; Komaki *et al.*, 2010), suggesting compensation mechanisms that are not understood so far. A moderate root skewing is the only phenotype previously described at whole-plant level, without a clear connection to the underlying microtubule (MT) network that EB1 proteins are thought to control somehow (Bisgrove *et al.*, 2008; Galva *et al.*, 2014; Gleeson *et al.*, 2012). Plant EB1 proteins are well conserved at the molecular level (Bisgrove *et al.*, 2008; Dixit *et al.*, 2006; Komaki *et al.*, 2010) and behave as MT plus-end-tracking proteins in cells (Abe and Hashimoto, 2005; Chan *et al.*, 2003; Dhonukshe *et al.*, 2005; Dixit *et al.*, 2006; Mathur *et al.*, 2003; Van Damme *et al.*, 2004). It was therefore undoubted that the interphasic MT network might be impacted, in a way, in EB1 mutant plants that display skewed roots. However, given the mild macroscopic phenotype in plants, we were not expecting severe consequences of EB1 mutations at the sub-cellular level.

To get insight into conserved and specific functions of plant-EB1 proteins regarding the interphasic MT network, we chose to investigate the *eb1a-2 eb1b-3* double-mutant plant lines (Col-0 ecotype) rather than triple mutant ones, since EB1c has been described as an exclusive nuclear protein playing a role in the course of the mitotic spindle assembly and positioning (Komaki *et al.*, 2010). Combining interphasic and mitotic dysfunctions would have indeed made more complex the analysis of sub-cellular and macroscopic phenotypes in triple EB1-mutant plants. Furthermore, this particular *eb1a-2 eb1b-3* genotype has the additional benefit

of being the only complete loss of function mutant for *EB1a* and *EB1b*, the two cytoplasmic-EB1 proteins, described so far (Hashimoto, 2015; Komaki *et al.*, 2010).

As expected, we showed a mild but significant disorganization of the MT network in *eb1a-2 eb1b-3* mutant plants compared to control in root and hypocotyl epidermal growing cells (Fig. 1A-F). Strengthening this result, FT-IR analysis revealed a modification of the cell wall architecture in elongating etiolated *eb1a-2 eb1b-3* hypocotyls (Fig. 1G). The essential involvement of cortical MTs in cellulose deposition and subsequent microfibrils organization (Baskin, 2001; Crowell *et al.*, 2009; Fujita *et al.*, 2011; Gutierrez *et al.*, 2009; Paredez *et al.*, 2006) explains this conspicuous impact of a moderate perturbation of the MT network upon the cell wall structuring. Interestingly, the middle zone of hypocotyl displays the strongest cell wall disorganization (Supplementary Fig. 2), suggesting a delay in the cell wall maturation in double-mutant plants compared to wild type. The MT-array disorganization, induced by AtEB1a and AtEB1b mutations, might have slowed down the cell wall assembly process along the growing etiolated hypocotyl. However, this process is not abolished since the mature zone, at the bottom of hypocotyl, displays similar FT-IR spectra at 990 cm^{-1} between both genotypes (Supplementary Fig. 2). Alternatively, the highest disorganization in the middle zone may result from the accumulation over time of cell wall assembly defaults, which might be eventually suppressed at the bottom by a compensation mechanism. This phenomenon may partly account for the weakness of the phenotype, at the whole-plant level, of double or triple EB1 mutants (Bisgrove *et al.*, 2008; Galva *et al.*, 2014; Komaki *et al.*, 2010).

MT dynamic instability is a key property to reorganize MT arrays in response to environmental cues or cellular requirements, in plants in particular (Lindeboom *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013). EB1 has been extensively described as a potent regulator of MT dynamics in non-plant eukaryotes (Akhmanova and Steinmetz, 2008; Akhmanova and Steinmetz, 2010;

Coquelle *et al.*, 2009; Galjart, 2010; Vitre *et al.*, 2008). Hence, a malfunction of the MT dynamics regulation may explain the perturbation of the MT network and the cell-wall texture modification in *eb1a-2 eb1b-3* mutant plants. Nevertheless, our investigations demonstrated that AtEB1a and AtEB1b are not significantly involved in the regulation of MT dynamics (Fig. 3B and C, Supplementary Table 2), unlike a recent publication showing a weak alteration of MT dynamicity in hypomorphic *eb1b-2* mutant plants (Galva *et al.*, 2014). In addition, our data allow us to conclude that EB1 is not the rescue factor needed for katanin-dependent MT reorientation process described elsewhere (Lindeboom *et al.*, 2013) (Fig. 3D). Hence, if we cannot exclude a contribution of EB1 to MT dynamics, our data indicates that a decrease of MT dynamicity does not account, on its own, to the MT network disorganization.

Besides a disordered MT array, *eb1a-2 eb1b-3* double-mutant plants display a reduced MT bundling (Fig. 2). According to the classical description, a transverse array of MTs is spring-shaped, but the rigidity of individual MTs does not allow them to visit every faces of the cell (Gittes *et al.*, 1993; Portran *et al.*, 2013), despite the help of softening factors (Ambrose *et al.*, 2011; Portran *et al.*, 2013). Thus, MTs from each side have to be laterally linked to each other by diverse factors such as MAP65 family members (Fache *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2011; Lucas *et al.*, 2011; Subramanian *et al.*, 2010). This lateral association is necessary for the organization of the entire network as shown *in vitro* (Smertenko *et al.*, 2004) or in yeast (Bratman and Chang, 2007) and can be locally observed as bundles. Plant cells have indeed two well accepted mechanisms to generate MT bundles (Dixit and Cyr, 2004a; Dixit and Cyr, 2004b; Ehrhardt, 2008; Fishel and Dixit, 2013): (1) a growing MT will zip along an existing older MT following their encounter or (2) during nucleation, the new MT will be created in a parallel manner to its mother MT, so as lateral interaction all along the MT lattices is favored. How EB1 proteins are involved in bundling is not clear yet but one can imagine two models that are obviously not mutually exclusive. On the one hand, because of

its localization at the growing plus-end of MTs, EB1 could be involved in the zippering activity, either by itself or through the recruitment of partners. On the other hand, given that animal EB1 has already been shown to be involved in MT nucleation either *in vitro* (Vitre et al., 2008) (at high concentration) or *in vivo* (Rogers et al., 2008), this function may be conserved in plant, as suggested before (Chan et al., 2003), and one can assume that plant EB1 proteins favor the MT-nucleation from a mother MT at shallow-angle rather than steep-angle. In order to verify both hypotheses, further experiments will be needed to carefully examine MT nucleation and crossover sites *in vivo* and *in vitro*, in the presence and in the absence of EB1 and other partners.

MT bundles also contribute to mechanical properties of cells and organs (Eisinger et al., 2012a; Eisinger et al., 2012b). As shown by a previous *in vitro* study, bundling increases the mechanical resistance of MTs to flexion (Portran et al., 2013). There is no experimental evidence for MTs as sensors of the mechanical stimulation but they are involved in response to mechanical cues (Landrein and Hamant, 2013). Hence, a disordered-MT network with fewer bundles (or fewer MTs per bundle) should be less resistant (*i.e.* more deformable) to mechanical stimulation, leading in all likelihood to a hyper-sensitivity to touch as observed in *eb1a-2 eb1b-3* double-mutant plants (Fig. 4). Yet, the MT network does not seem to be disorganized enough to impair gravitropism. The increased sensitivity of double-mutant plants to medium hardness (Fig. 4) fits well with previous studies (Bisgrove et al., 2008; Gleeson et al., 2012) showing that EB1 is involved in the balance between gravitropism and thigmotropism. Here, we propose that the function of EB1 proteins in this regulation is based on the maintenance of the MT network organization (proposed model in Fig. 6).

The model presented here links both disordered MT array and bundling defect to the root skewing by the putative direct or indirect involvement of cortical MTs in the perception of mechanical stimulations. This model explains the results obtained here and is consistent

with previous studies (Bisgrove *et al.*, 2008; Galva *et al.*, 2014; Gleeson *et al.*, 2012), but it remains to be clarified. In particular, the functional relationship between MT-bundling and the MT-network organization has to be further investigated, even though bundling might be a structuring activity for the entire cortical network (Smertenko *et al.*, 2004). Additionally, the detailed contribution of the cortical MT-network to the mechanical properties of epidermal cells and to the thigmotropism has to be elucidated.

In conclusion, we have provided first evidence for a role of cytoplasmic-EB1 proteins in MT organization in plant cells, without modulating MT dynamics in a significant manner. Our data further emphasize the involvement of MTs in plant development and strongly suggest that cortical MT arrays contribute to the mechanical properties of plant cells. This study also reveals specific EB1 functions in plants that could be related to their atypical C-terminal extremities and subsequent yet unknown interacting partners. The relatively mild phenotypes described here do not preclude an essential role for EB1 proteins in plants. They may be crucial in local MT-array adjustments in response to environmental constraints that we did not reproduce in our experiments. However, these mild phenotypes allow to dwell on more mechanistic details than more severe ones leading to lethality or to dramatic pleiotropic impairments. Hence, tuning experimental conditions will be critical to shed more light on EB1 functions in plant survival and adaptation to external stresses.

Experimental Procedures

Arabidopsis lines

GFP labeled lines (35S::GFP:TuA6 and 35S::GFP:TuA6 *eb1a-2 eb1b-3*), and single *eb1a-2* and *eb1b-3* mutants are gifts from prof. T. Ashimoto (Komaki et al., 2010; Ueda et al., 1999). A *eb1a-2 eb1b-3* double-mutant was generated by crossing the corresponding single-mutant lines (Supplementary Table 1).

We performed PCR using following conditions: 30 cycles; 30 seconds at 92°C; 30 seconds at 55°C and 72°C for 30 seconds to identified homozygous seedlings. First cycle was preceded by 5 minutes at 92°C and last cycle was followed by 5 minutes at 72°C.

eb1a-2 T-DNA insertion was checked using 5'-AAC GTC CGC AAT GTG TTA TTA AGT TGT C -3' and 5'-GCA AAC AAA CAA TAA CCA TC -3' PCR primers. MseI enzyme was used (Thermo Scientific FD2174), on PCR amplicons produced with 5'- TTG AAG CAA AGA ACG AGT ACG A -3' and 5'- TGG AAG TAG CCA CAG GAG GA -3' primers, to confirm the presence of the MseI restriction site created in the EB1b gene by *eb1b-3* point mutation.

Growth conditions

Seeds were surface sterilized in 70% (v/v) ethanol, 0.05% (v/v) Tween-20 for 10 minutes and stratified on growth medium for 12 hours at 4°C in the dark. Growth medium: half strength Murashige and Skoog solid medium composed of 2.15 g.L⁻¹ MS Basal Salt Mixture (Sigma, M5524), 5 g.L⁻¹ Sucrose (Merck, 1.07651.1000), 0.59 g.L⁻¹ 2-(N-morpholino)ethanesulphonic acid, pH 5.6 and 3 g.L⁻¹, 6 g.L⁻¹ or 9 g.L⁻¹ of Gelzan (Sigma G1910) or PhytoAgar (Duchefa Biochemie, P1003.1000). Seedlings were grown vertically for 4 days in the dark at 20°C after exposure to light for 6 hours (hypocotyl investigations) or 7 days at 20°C with a 16-h light/8-h dark photoperiod (root investigations) in growth chamber (Panasonic MLR-352). Plates were sealed with gas-permeable medical tape (Urgo Medical).

Whole-plant investigation

After 7 days of growth, plates were opened, turned to horizontal position and photographed, seedlings facing the camera.

Light Microscopy

All observations were done on epidermal cells of elongating zone of hypocotyl or root.

For MT network organization images were acquired using a Nipkow Spinning Disk confocal system (Yokogawa CSU-X1-A1) mounted on a Nikon Eclipse Ti E inverted microscope, equipped with Nikon APO TIRF X100/1.49 oil immersion objective. We used a single band 491 nm (Semrock) dichroic mirror combined with a Bandpass 525/45 nm (Semrock) emission filter.

For the measurement of dynamic-instability parameters, movies were acquired by Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) using Nikon Eclipse Ti microscope equipped with a Nikon TIRF Illuminator Unit and with an APO TIRF X100/1.49 oil immersion objective. We used a Triple band 405/491/561 nm (Semrock) dichroic mirror and a Bandpass 525/50 nm (Chroma) emission filter. Photobleaching parameters were controlled by iLAS2 module (Roper Scientifics). The whole system was driven by MetaMorph software (Molecular Devices). Images were recorded with a CoolSNAP HQ2 CCD camera (Photometrics). Blue (491 nm Cobolt Calypso DPSS, 100mW) laser was used for excitation of the GFP and photobleaching.

For super resolution STimulated Emission Depletion (STED) microscopy on living plants, we used a DMi 6000 TCS SP8X – gated STED (LEICA) microscope equipped with a HCX PL APO 100x/1.40 STED oil immersion objective and a continuous 592 nm depletion laser. To obtain STED and confocal acquisitions of the same field of view, we used the sequential mode. During STED first sequence, a 592 nm depletion laser was combined with a 491 nm excitation wavelength. During confocal acquisitions, depletion laser was turned off.

Both images were obtained with 4-times line accumulation and the emission was collected on GaAsP Hybrid (Hamamatsu) detector in time-gating mode (between 1 ns and 6 ns).

Numerical zoom (x5.7) and image size (1024*1024) were chosen to obtain a final pixel size of 20 nm. Scanning speed was 400 Hz to deal with living sample movement and signal strength. Confocal and STED images were denoised using the Huygens Essential Package (Scientific Volume Imaging, Hilversum, The Netherlands).

In every case, to avoid stress-related MT re-organization, the observation time never exceeded 20 minutes after the seedlings were mounted in the dark between slides and coverslips in liquid half M&S medium. For auxin treatment, 4-days-old etiolated seedlings were mounted in the dark under green light, between slides and coverslips, in half M&S medium containing 10 μ M of Indole-3-acetic acid (IAA), and then slides were kept vertical in the dark at room temperature for 15 to 60 minutes and observed for less than 20 minutes.

FT-IR

4-days old etiolated plants were used for FT-IR acquisitions. Seedlings were fixed in 70% v/v ethanol solution overnight and transfer in water overnight the day before de data acquisition. The rehydrated seedlings were then lie down on gold-coated microscope slides and let to dry for 20 min. at 37°C. The zone targeted for the acquisition of spectra was the top (below the hook), middle and bottom of the hypocotyl. Spectra were collected using a Thermo Scientific Nicolet iN10 MX FT-IR Microscope. Eight interferograms were collected reflexion mode with 8 cm^{-1} resolution and co-added to improve the signal-to-noise ratio of the spectrum.

Image Analysis

- MT network disorganization

Individual cells were cropped from spinning disk images. We used FibrilTool ImageJ plug-in (Boudaoud *et al.*, 2014) to quantify the organization of the MT array in each cell. The

plug-in output is a value of anisotropy which may vary from 0 (isotropic or totally disorganized array) to 1 (perfect parallel MTs) (Boudaoud et al., 2014).

- MT Bundling

Classical scanning confocal images acquired immediately after STED images have been used to quantify the bundling of MTs in each genetic context (living seedlings). STED images were used as control to verify the accuracy of the quantification. Firstly, images from each genotype were stacked and normalized using the appropriate ImageJ functions. Quantification of bundling was then made using an ImageJ macro developed in the team. The procedure is semi-automated, needing user intervention at some points. For each image, standard deviation to the mean of pixel intensity was subtracted, in order to get rid of the detector noise. Briefly, 50X100 pixels regions of interest (ROI) were centered manually on a MT fluorescent track. Areas under each MT portion were then measured using plot profile from the Gel Analyser ImageJ function. The Macro output is a list of quantified areas, which were then normalized and analyzed using Excel (Microsoft) and Prism software (GraphPad Software).

An average of ten portions of MTs have been analyzed in each image. Totals of 270 and 276 measurements have been performed for the control and for the double-mutant genotype respectively. In each data collection, results have been normalized by dividing areas by the smallest area. Hence, this ratio is a relative quantification of the number of MTs in each track analyzed. STED images allowed us to confirm that the number of MTs visible in STED correspond approximately to the ratio value (see Fig. 2A).

- MT Dynamics

We first de-noised movie pictures by subtracting standard deviation to the mean of pixel intensity from each image and by applying a difference of Gaussian filter (DOG). MTs growth and shrinking rates were then determined using KymoToolBox ImageJ plug-in (F. Cordelières). To make easier kymographs analysis, we performed image treatment, inspired

from Lindeboom *et al.*, 2013 (Lindeboom *et al.*, 2013), in order to distinguish with false colors growth and shrinkage events. Briefly, consecutive image subtraction ($I_{n+1} - I_n$) was used to reveal growing and shrinking MTs + ends as spots of positive or negative intensity. False colors were used to highlight MT body, growing-ends and shrinking-ends in red, green and blue respectively, in order to better distinguish stages transitions (catastrophe and rescue) on kymographs (Fig. 3A). See Table S1 for experimental values.

- Auxin re-orientation assay

Each cell image was rotated to be oriented horizontally. Each cell was analyzed using FibrilTool ImageJ plug-in (Boudaoud *et al.*, 2014). The MT network orientation angle was used to determine the organization of the MT network; transverse (70° - 90°), longitudinal (0° - 20°) or oblique (20° - 70°).

- Root skewing

We drew a line going through the collar and the root tip on each images of 7-days-old plants grown on vertical plates, and measured the deviation angle from a vertical line using ImageJ build-in functions.

- Root length

Root length was measured from images of 7-days-old plants grown on vertical plates. Pictures were analyzed with NeuronJ plugin (Meijering *et al.*, 2004). Images were calibrated according to the ruler placed next to each plate on pictures.

Statistical Analysis

Statistical Analyses were performed using R software for FT-IR data and Prism software (GraphPad Software) for all the other experiments.

- MT network organization

Images analyzed came from 2 biological repetitions for hypocotyl and from 3 biological repetitions for the root. 109 cells from the control and 77 cells from the double

mutant were analyzed for hypocotyl and 132 cells from the control and 112 cells from the double mutant were analyzed for the root. Data normality was tested using KS normality test, d'Agostino and Pearson omnibus normality test and Shapiro-Wilcoxon normality test. In the case of the hypocotyl, all three tests conclude that data fit a normal distribution, while all tests conclude that data does not fit a normal distribution for the root. Hence, we decided to use a non-parametric Mann Whitney test with $\alpha=0.01$ for both data collections. Differences between control and double mutant were significant in both organs with $p=0.0009$ for the hypocotyl and with $p<0.0001$ for the root.

- Cell Wall architecture

For each genotype, a total of 20 FT-IR spectra were acquired from 5 individual hypocotyls of 4 independent biological repeats. The collected spectra were baseline corrected and normalized as described before (Mouille *et al.*, 2003). Wave numbers for which absorbance values are significantly different between genotypes were identified using a Student's *t*-test.

- MT bundle quantification

Data came from 3 biological repetitions. We analyzed 29 different plants for a total of 270 and 276 MTs analyzed for control and double mutant respectively. Data normality was tested using KS normality test, d'Agostino and Pearson omnibus normality test and Shapiro-Wilcoxon normality test. It appears that data doesn't fit to a normal distribution so we decided to use a Mann Whitney test with $\alpha=0.01$ to compare genotypes. Difference was significant with $p<0.0001$. To facilitate data comparison, histogram of frequencies distribution upon the whole population with four classes; $1<\dots<2$, $2<\dots<3$, $3<\dots<4$ and >4 , has been used to compare the two distribution using a Chi-squared test and it appears that samples are significantly different with $p=0.0006$.

- MT dynamic instability

Parameters of MT dynamic instability were determined from 3 biological repetitions, for a total of 8 plants per genotype. For each parameter (growth rate, shrinking rate, rescue frequency and catastrophe frequency) an averaged value was calculated for each plant and then the eight values obtained were compared using a non-parametric Mann Whitney t-test with $\alpha=0.05$. Differences between control and double mutant were not significant.

- Auxin re-orientation assay

For each time point, at least 59 cells from 10 seedlings from 2 biological repetitions have been analyzed. Frequencies at each time point were compared using Chi-squared t-test with $\alpha=0.05$ and differences were not significant.

- Root length and skewing

Data came from 3 biological repetitions. $76 < n < 104$ for length; $84 < n < 103$ for skewing. Normality of the data was tested using KS normality test, d'Agostino and Pearson omnibus normality test and Shapiro-Wilcoxon normality test. The normality was not ensured for certain experiments, so that we decided to use a Kruskal-Wallis test with $\alpha=0.05$. Significant differences are highlighted by a letter.

References

- Abe, T. and Hashimoto, T.** (2005). Altered microtubule dynamics by expression of modified alpha-tubulin protein causes right-handed helical growth in transgenic Arabidopsis plants. *The Plant journal* **43**, 191-204.
- Akhmanova, A. and Steinmetz, M. O.** (2008). Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 309-22.
- Akhmanova, A. and Steinmetz, M. O.** (2010). Microtubule +TIPs at a glance. *J Cell Sci* **123**, 3415-9.
- Ambrose, C., Allard, J. F., Cytrynbaum, E. N. and Wasteneys, G. O.** (2011). A CLASP-modulated cell edge barrier mechanism drives cell-wide cortical microtubule organization in Arabidopsis. *Nat Commun* **2**, 430.
- Amos, L. A. and Schlieper, D.** (2005). Microtubules and maps. *Adv. Protein Chem* **71**, 257-98.
- Andreeva, Z., Barton, D., Armour, W. J., Li, M. Y., Liao, L. F., McKellar, H. L., Pethybridge, K. A. and Marc, J.** (2010). Inhibition of phospholipase C disrupts cytoskeletal organization and gravitropic growth in Arabidopsis roots. *Planta* **232**, 1263-79.
- Anthony, R. G. and Hussey, P. J.** (1999). Dinitroaniline herbicide resistance and the microtubule cytoskeleton. *Trends Plant Sci* **4**, 112-116.
- Baskin, T. I.** (2001). On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: a review and a model. *Protoplasma* **215**, 150-71.
- Beinhauer, J. D., Hagan, I. M., Hegemann, J. H. and Fleig, U.** (1997). Mal3, the fission yeast homologue of the human APC-interacting protein EB-1 is required for microtubule integrity and the maintenance of cell form. *The Journal of cell biology* **139**, 717-28.
- Bisgrove, S. R., Lee, Y. R., Liu, B., Peters, N. T. and Kropf, D. L.** (2008). The microtubule plus-end binding protein EB1 functions in root responses to touch and gravity signals in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**, 396-410.
- Boudaoud, A., Burian, A., Borowska-Wykret, D., Uyttewaal, M., Wrzalik, R., Kwiatkowska, D. and Hamant, O.** (2014). FibrilTool, an ImageJ plug-in to quantify fibrillar structures in raw microscopy images. *Nat Protoc* **9**, 457-63.
- Bratman, S. V. and Chang, F.** (2007). Stabilization of overlapping microtubules by fission yeast CLASP. *Dev Cell* **13**, 812-27.
- Chan, J., Calder, G. M., Doonan, J. H. and Lloyd, C. W.** (2003). EB1 reveals mobile microtubule nucleation sites in Arabidopsis. *Nature cell biology* **5**, 967-71.
- Coquelle, F. M., Vitre, B. and Arnal, I.** (2009). Structural basis of EB1 effects on microtubule dynamics. *Biochem Soc Trans* **37**, 997-1001.
- Crowell, E. F., Bischoff, V., Desprez, T., Rolland, A., Stierhof, Y. D., Schumacher, K., Gonneau, M., Hofte, H. and Vernhettes, S.** (2009). Pausing of Golgi bodies on microtubules regulates secretion of cellulose synthase complexes in Arabidopsis. *The Plant cell* **21**, 1141-54.
- Dhonukshe, P., Mathur, J., Hulskamp, M. and Gadella, T. W., Jr.** (2005). Microtubule plus-ends reveal essential links between intracellular polarization and localized modulation of endocytosis during division-plane establishment in plant cells. *BMC Biol* **3**, 11.
- Dixit, R., Chang, E. and Cyr, R.** (2006). Establishment of polarity during organization of the acentrosomal plant cortical microtubule array. *Molecular biology of the cell* **17**, 1298-305.

Dixit, R. and Cyr, R. (2004a). The cortical microtubule array: from dynamics to organization. *Plant Cell* **16**, 2546-52.

Dixit, R. and Cyr, R. (2004b). Encounters between dynamic cortical microtubules promote ordering of the cortical array through angle-dependent modifications of microtubule behavior. *Plant Cell* **16**, 3274-84.

Ehrhardt, D. W. (2008). Straighten up and fly right: microtubule dynamics and organization of non-centrosomal arrays in higher plants. *Current opinion in cell biology* **20**, 107-16.

Eisinger, W., Ehrhardt, D. and Briggs, W. (2012a). Microtubules are essential for guard-cell function in *Vicia* and *Arabidopsis*. *Mol Plant* **5**, 601-10.

Eisinger, W. R., Kirik, V., Lewis, C., Ehrhardt, D. W. and Briggs, W. R. (2012b). Quantitative changes in microtubule distribution correlate with guard cell function in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **5**, 716-25.

Elliott, S. L., Cullen, C. F., Wrobel, N., Kernan, M. J. and Ohkura, H. (2005). EB1 is essential during *Drosophila* development and plays a crucial role in the integrity of chordotonal mechanosensory organs. *Molecular biology of the cell* **16**, 891-901.

Fache, V., Gaillard, J., Van Damme, D., Geelen, D., Neumann, E., Stoppin-Mellet, V. and Vantard, M. (2010). *Arabidopsis* kinetochore fiber-associated MAP65-4 cross-links microtubules and promotes microtubule bundle elongation. *Plant Cell* **22**, 3804-15.

Fishel, E. A. and Dixit, R. (2013). Role of nucleation in cortical microtubule array organization: variations on a theme. *The Plant journal : for cell and molecular biology*.

Fujita, M., Himmelspach, R., Hocart, C. H., Williamson, R. E., Mansfield, S. D. and Wasteneys, G. O. (2011). Cortical microtubules optimize cell-wall crystallinity to drive unidirectional growth in *Arabidopsis*. *The Plant journal* **66**, 915-28.

Galjart, N. (2010). Plus-end-tracking proteins and their interactions at microtubule ends. *Curr Biol* **20**, R528-37.

Galva, C., Kirik, V., Lindeboom, J. J., Kaloriti, D., Rancour, D. M., Hussey, P. J., Bednarek, S. Y., Ehrhardt, D. W. and Sedbrook, J. C. (2014). The microtubule plus-end tracking proteins SPR1 and EB1b interact to maintain polar cell elongation and directional organ growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**, 4409-25.

Gardiner, J. and Marc, J. (2003). Putative microtubule-associated proteins from the *Arabidopsis* genome. *Protoplasma* **222**, 61-74.

Gittes, F., Mickey, B., Nettleton, J. and Howard, J. (1993). Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J Cell Biol* **120**, 923-34.

Gleeson, L., Squires, S. and Bisgrove, S. R. (2012). The microtubule associated protein END BINDING 1 represses root responses to mechanical cues. *Plant science : an international journal of experimental plant biology* **187**, 1-9.

Granger, C. L. and Cyr, R. J. (2001). Spatiotemporal relationships between growth and microtubule orientation as revealed in living root cells of *Arabidopsis thaliana* transformed with green-fluorescent-protein gene construct GFP-MBD. *Protoplasma* **216**, 201-14.

Green, P. B. (1962). Mechanism for Plant Cellular Morphogenesis. *Science* **138**, 1404-5.

Gutierrez, R., Lindeboom, J. J., Paredes, A. R., Emons, A. M. and Ehrhardt, D. W. (2009). *Arabidopsis* cortical microtubules position cellulose synthase delivery to the plasma membrane and interact with cellulose synthase trafficking compartments. *Nat Cell Biol* **11**, 797-806.

- Hamada, T.** (2014). Microtubule organization and microtubule-associated proteins in plant cells. *Int Rev Cell Mol Biol* **312**, 1-52.
- Hashimoto, T.** (2015). Microtubules in plants. *Arabidopsis Book* **13**, e0179.
- Ho, C. M., Hotta, T., Guo, F., Roberson, R. W., Lee, Y. R. and Liu, B.** (2011). Interaction of antiparallel microtubules in the phragmoplast is mediated by the microtubule-associated protein MAP65-3 in Arabidopsis. *Plant Cell* **23**, 2909-23.
- Ishida, T., Kaneko, Y., Iwano, M. and Hashimoto, T.** (2007). Helical microtubule arrays in a collection of twisting tubulin mutants of Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8544-9.
- Khalid, A. M., Bhatti, T. M., Shoukat, M., Qadir, G. and Hayat, M. N.** (1993). A simple apparatus for measuring hardness of agar and Gelrite plates. *World J Microbiol Biotechnol* **9**, 128-30.
- Komaki, S., Abe, T., Coutuer, S., Inze, D., Russinova, E. and Hashimoto, T.** (2010). Nuclear-localized subtype of end-binding 1 protein regulates spindle organization in Arabidopsis. *J Cell Sci* **123**, 451-9.
- Landrein, B. and Hamant, O.** (2013). How mechanical stress controls microtubule behavior and morphogenesis in plants: history, experiments and revisited theories. *The Plant journal* **75**, 324-38.
- Ledbetter, M. C. and Porter, K. R.** (1963). A "Microtubule" in Plant Cell Fine Structure. *The Journal of cell biology* **19**, 239-50.
- Lee, L., Tirnauer, J. S., Li, J., Schuyler, S. C., Liu, J. Y. and Pellman, D.** (2000). Positioning of the mitotic spindle by a cortical-microtubule capture mechanism. *Science* **287**, 2260-2.
- Lindeboom, J. J., Nakamura, M., Hibbel, A., Shundyak, K., Gutierrez, R., Ketelaar, T., Emons, A. M., Mulder, B. M., Kirik, V. and Ehrhardt, D. W.** (2013). A mechanism for reorientation of cortical microtubule arrays driven by microtubule severing. *Science* **342**, 1245533.
- Lloyd, C. W., Clayton, L., Dawson, P. J., Doonan, J. H., Hulme, J. S., Roberts, I. N. and Wells, B.** (1985). The cytoskeleton underlying side walls and cross walls in plants: molecules and macromolecular assemblies. *J Cell Sci Suppl* **2**, 143-55.
- Lucas, J. R., Courtney, S., Hassfurder, M., Dhingra, S., Bryant, A. and Shaw, S. L.** (2011). Microtubule-associated proteins MAP65-1 and MAP65-2 positively regulate axial cell growth in etiolated Arabidopsis hypocotyls. *Plant Cell* **23**, 1889-903.
- Mathur, J., Mathur, N., Kernebeck, B., Srinivas, B. P. and Hulskamp, M.** (2003). A novel localization pattern for an EB1-like protein links microtubule dynamics to endomembrane organization. *Curr Biol* **13**, 1991-7.
- McCann, M. C., Hammouri, M., Wilson, R., Belton, P. and Roberts, K.** (1992). Fourier transform infrared microspectroscopy is a new way to look at plant cell walls. *Plant Physiol* **100**, 1940-7.
- Meagher, R. B. and Fechheimer, M.** (2003). The Arabidopsis cytoskeletal genome. *Arabidopsis Book* **2**, e0096.
- Meijering, E., Jacob, M., Sarria, J. C., Steiner, P., Hirling, H. and Unser, M.** (2004). Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images. *Cytometry A* **58**, 167-76.
- Mitchison, T. and Kirschner, M.** (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**, 237-42.
- Morrison, E. E.** (2007). Action and interactions at microtubule ends. *Cell. Mol. Life Sci* **64**, 307-17.

Mouille, G., Robin, S., Lecomte, M., Pagant, S. and Hofte, H. (2003). Classification and identification of Arabidopsis cell wall mutants using Fourier-Transform InfraRed (FT-IR) microspectroscopy. *The Plant journal* **35**, 393-404.

Neupane, B., Ligler, F. S. and Wang, G. (2014). Review of recent developments in stimulated emission depletion microscopy: applications on cell imaging. *Journal of biomedical optics* **19**, 080901.

Paredez, A. R., Somerville, C. R. and Ehrhardt, D. W. (2006). Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science* **312**, 1491-5.

Portran, D., Zoccoler, M., Gaillard, J., Stoppin-Mellet, V., Neumann, E., Arnal, I., Martiel, J. L. and Vantard, M. (2013). MAP65/Ase1 promote microtubule flexibility. *Mol Biol Cell* **24**, 1964-73.

Rogers, G. C., Rusan, N. M., Peifer, M. and Rogers, S. L. (2008). A multicomponent assembly pathway contributes to the formation of acentrosomal microtubule arrays in interphase Drosophila cells. *Mol Biol Cell* **19**, 3163-78.

Rogers, S. L., Rogers, G. C., Sharp, D. J. and Vale, R. D. (2002). Drosophila EB1 is important for proper assembly, dynamics, and positioning of the mitotic spindle. *J. Cell Biol* **158**, 873-84.

Schuyler, S. C. and Pellman, D. (2001). Microtubule "plus-end-tracking proteins". the end is just the beginning. *Cell* **105**, 421-4.

Schwartz, K., Richards, K. and Botstein, D. (1997). BIM1 encodes a microtubule-binding protein in yeast. *Mol Biol Cell* **8**, 2677-91.

Sedbrook, J. C., Ehrhardt, D. W., Fisher, S. E., Scheible, W. R. and Somerville, C. R. (2004). The Arabidopsis sku6/spiral1 gene encodes a plus end-localized microtubule-interacting protein involved in directional cell expansion. *Plant Cell* **16**, 1506-20.

Smertenko, A. P., Chang, H. Y., Wagner, V., Kaloriti, D., Fenyk, S., Sonobe, S., Lloyd, C., Hauser, M. T. and Hussey, P. J. (2004). The Arabidopsis microtubule-associated protein AtMAP65-1: molecular analysis of its microtubule bundling activity. *Plant Cell* **16**, 2035-47.

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

Sugimoto, K., Williamson, R. E. and Wasteneys, G. O. (2000). New techniques enable comparative analysis of microtubule orientation, wall texture, and growth rate in intact roots of Arabidopsis. *Plant Physiol* **124**, 1493-506.

Tirnauer, J. S., Canman, J. C., Salmon, E. D. and Mitchison, T. J. (2002). EB1 targets to kinetochores with attached, polymerizing microtubules. *Molecular biology of the cell* **13**, 4308-16.

Ueda, K., Matsuyama, T. and Hashimoto, T. (1999). Visualization of microtubules in living cells of transgenic Arabidopsis thaliana. *Protoplasma* **206**, 201-206.

Van Damme, D., Bouget, F. Y., Van Poucke, K., Inze, D. and Geelen, D. (2004). Molecular dissection of plant cytokinesis and phragmoplast structure: a survey of GFP-tagged proteins. *The Plant journal* **40**, 386-98.

Vitre, B., Coquelle, F. M., Heichette, C., Garnier, C., Chretien, D. and Arnal, I. (2008). EB1 regulates microtubule dynamics and tubulin sheet closure in vitro. *Nature cell biology* **10**, 415-21.

Wen, Y., Eng, C. H., Schmoranzer, J., Cabrera-Poch, N., Morris, E. J., Chen, M., Wallar, B. J., Alberts, A. S. and Gundersen, G. G. (2004). EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nature cell biology* **6**, 820-30.

Wieczorek, M., Bechstedt, S., Chaaban, S. and Brouhard, G. J. (2015). Microtubule-associated proteins control the kinetics of microtubule nucleation. *Nat Cell Biol* **17**, 907-16.

Zhang, Q., Fishel, E., Bertroche, T. and Dixit, R. (2013). Microtubule severing at crossover sites by katanin generates ordered cortical microtubule arrays in Arabidopsis. *Curr Biol* **23**, 2191-5.

Acknowledgements

We are very grateful to Prof. Takashi Hashimoto for providing us with transgenic and mutant plant lines, to Dr. Fabrice Cordelières for the KymoToolBox ImageJ Plug-In, to Dr. Valérie Nicolas (Institut Paris-Sud d'innovation thérapeutique) for the use of the STED microscope and to Emilie Gineau who participated to biochemical analyses of cell-wall components. This work has been performed in the group of Dr. Béatrice Satiat-Jeunemaître who provided infrastructures needed for the project development. We thank Dr. Béatrice Satiat-Jeunemaître for kind supports and critical reading of the manuscript. We also thank Dr. Michele Bianchi for fruitful advices and for critical reading of the manuscript. We warmly acknowledge Drs Laurie Grandont, Olivier Hamant and Catherine Perrot-Recheinmann for helpful discussions and advices.

The I2BC benefits from the support of the LabEx Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-10-LABX-0040-SPS). This work was supported by a grant from the Université Paris-Sud - “Attractivité - 2013” Program to FMC. ATM was supported by a doctoral fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

This work has benefited from the facilities and expertise of the light microscopy facilities of Imagerie-Gif (I2BC), (<http://www.i2bc.paris-saclay.fr/spip.php?article278>). This core facility is member of the Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie (IBiSA), and is supported by the French national Research Agency under Investments for the Future programs “France-BioImaging”, and the Labex “Saclay Plant Science” (ANR-10-INSB-04-01 and ANR-11-IDEX-0003-02, respectively). This work is also supported by the "Lidex-Biologie Intégrative des Génomes" project funded by the IDEX Paris-Saclay, ANR-11-IDEX-0003-02.

Author Contributions

FMC and ATM conceived the study. ATM and FMC designed and planned the experiments. ATM executed most of the experiments. ATM and FMC performed image analysis. JM helped in the generation of several Arabidopsis lines and in the study of macroscopic phenotypes. SC and GM performed cell-wall analysis (FT-IR and biochemical analysis). LB contributes to set up parameters for STED microscopy. JPD participated in the project elaboration and helped with image acquisition and interpretation. FMC and ATM wrote the paper.

Competing financial interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

Figure Legends

Figure 1: MT network disorganization in *eb1a-2 eb1b-3* double mutant.

Representative pictures of GFP-labeled microtubules in elongating epidermal cells from etiolated-hypocotyl (**A** and **B**) and root (**D** and **E**). The elongation axis is horizontal. Scale bar, 5 μm . In the double mutant (**B** and **E**) the microtubule network is disorganized compared to the control (**A** and **D**) as shown by the quantification of MT network anisotropy (**C** and **F**) in etiolated-hypocotyl cells (**C**) and in root cells (**F**) for both control (n=109 and n=132) and *eb1a-2 eb1b-3* (n=77 and n=112) genotypes. Crosses represent the mean, bars represent the median, and whiskers indicate minima and maxima. Asterisks indicate statistically significant differences (p=0.0009, t-test, $\alpha=0.01$ in **C** and p<0.0001, t-test, $\alpha=0.01$ in **F**) according to a Mann-Whitney t-test. (**G**) Student's t test: t-value for the comparison between control (Col0) and *eb1a-2 eb1b-3* FT-IR spectra, obtained in the upper part of the hypocotyl, plotted against the wavenumber (x-axis). n=20 for each genotype. Asterisks indicate a statistically significant difference (t-test, p=0.95). The horizontal lines indicate the significance limit values (p=0.95).

Figure 2: Bundling is impaired in *eb1a-2 eb1b-3* double mutant.

(**A**) The graph shows that the number of MTs within a fluorescence track is proportional to the area under the plot profile (values indicated under the curves in AU). STED imaging reveals that the red-bordered track is made of at least three parallel MTs, whereas the blue-bordered one is made of at least one MT, which is consistent with the plot profiles and the values. (**B**) Frequency distribution of the number of MTs per track in both genotypes (n=270 for the control and n=276 for the double mutant) based on the proportionality demonstrated in **A**. Asterisks indicate statistically significant differences (p=0.0006, Chi-square, $\alpha=0.01$), bars represent the SEM. Pictures showing confocal images (**C** and **E**) and STED images (**D** and **F**) of the same cell in control (**C** and **D**) and *eb1a-2 eb1b-3* double mutant (**E** and **F**) hypocotyl

epidermal cells. White arrowheads indicate MTs bundles (*i.e.* one MT in confocal appearing as more than one MT in STED). Insets (yellow squares) showing details of MT. Yellow number in insets indicate the quantification of the number of MT in the selection based on the method described in **A**. Scale bar, 5 μm .

Figure 3: The microtubule dynamic instability is not affected in *eb1a-2 eb1b-3* double mutant.

(**A**) Kymographs showing the same MT before and after image treatment (first and second panels on the left). Image subtraction reveals growth and shrinking events (middle panels). Color encoding facilitates the interpretation of kymograph. Growth events, shrinkage events and entire microtubules appear in green, blue and red respectively on the merged image (right panel). (**B**) Growth and shrinking rates of MT plus-end in control (n=158) and *eb1a-2 eb1b-3* double mutant (n=125). Bars indicate SEM. (**C**) Transition frequencies in control (n=158) and *eb1a-2 eb1b-3* double mutant (n=125). Bars indicate SEM. (**D**) Effectives of cells (in %) with transverse (70° - 90°), longitudinal (0° - 20°) or oblique (20° - 70°) MT network organization during auxin treatment in control and double-mutant plants (both expressing GFP-tubulin). Differences are not significant according to Chi-squared t-test.

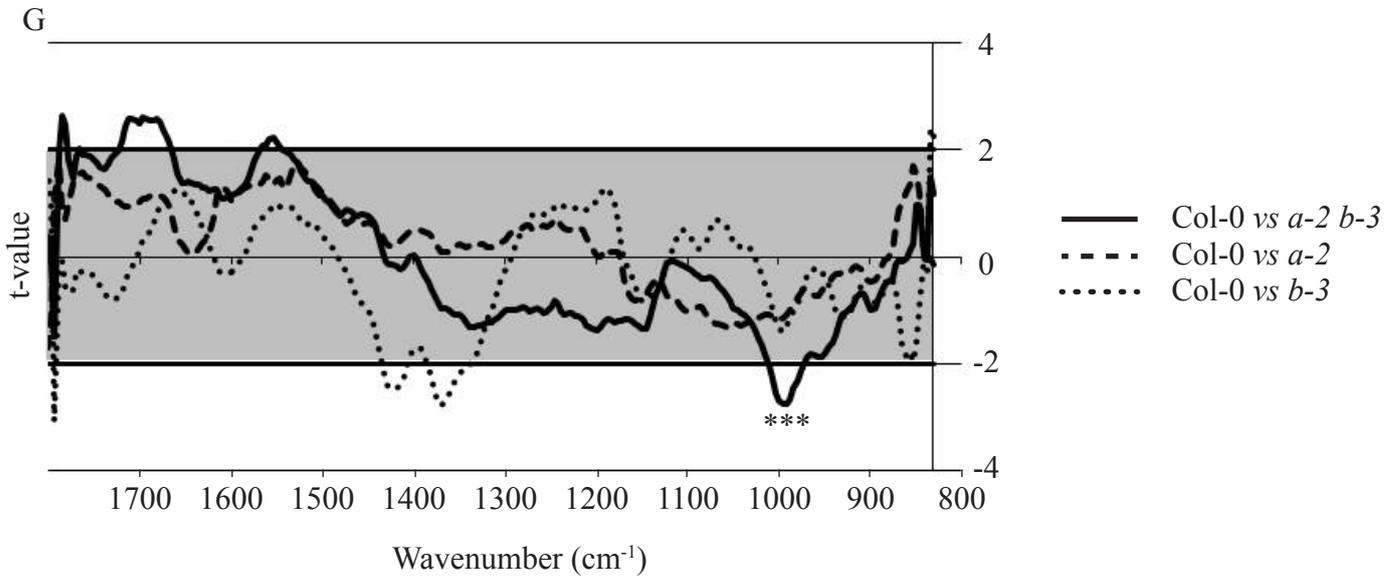
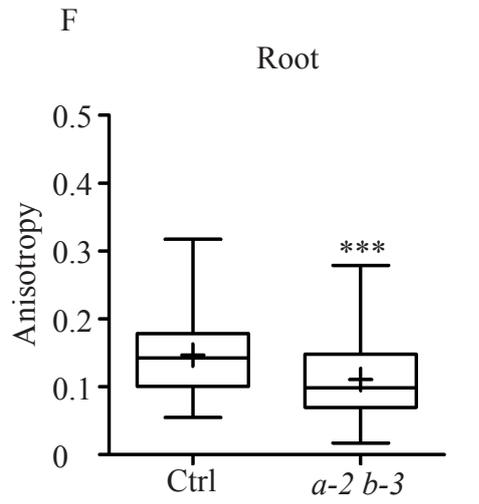
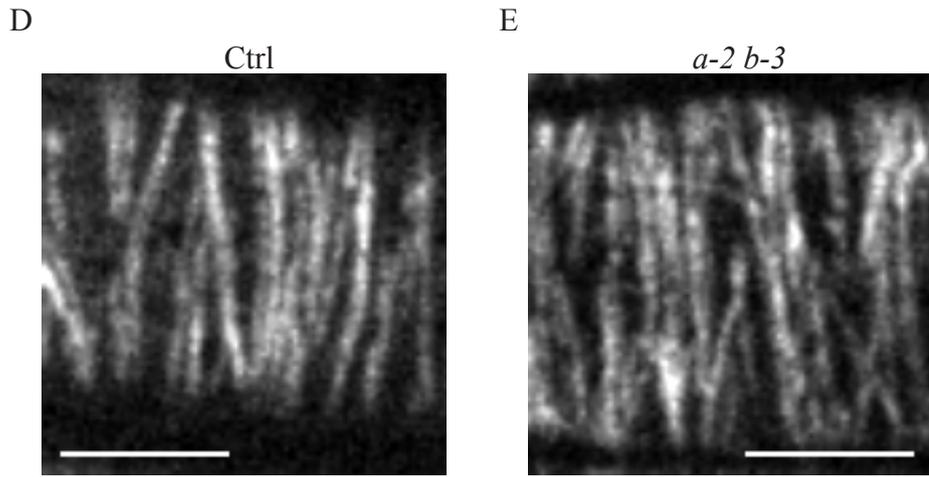
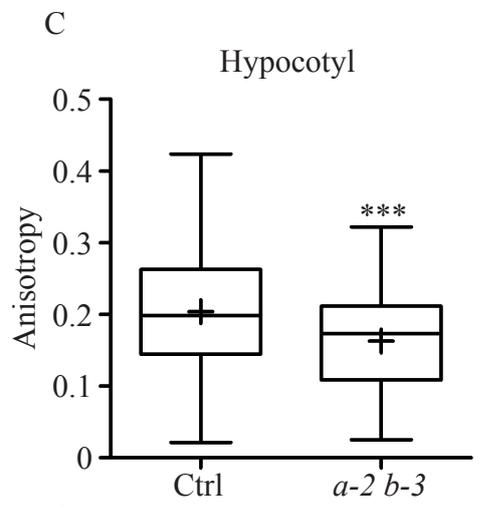
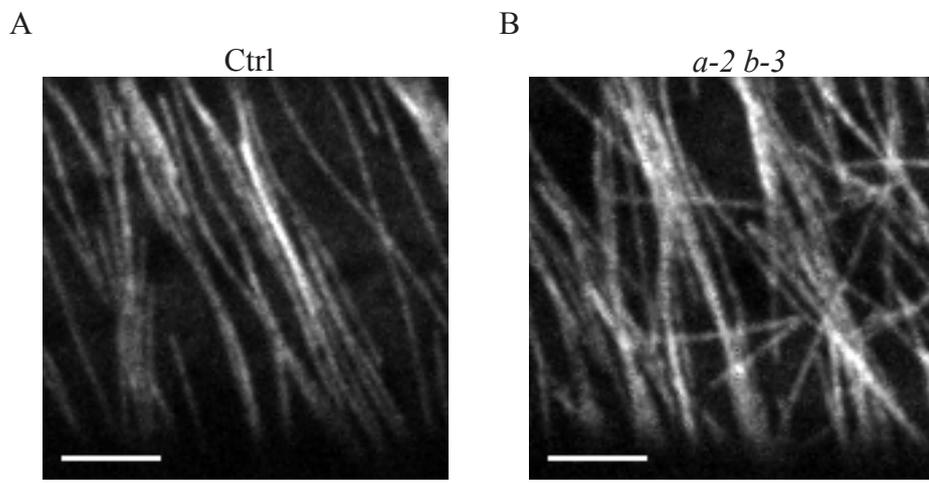
Figure 4: Hypersensitivity of *eb1a-2 eb1b-3* double mutant roots to touch response induced by medium hardness.

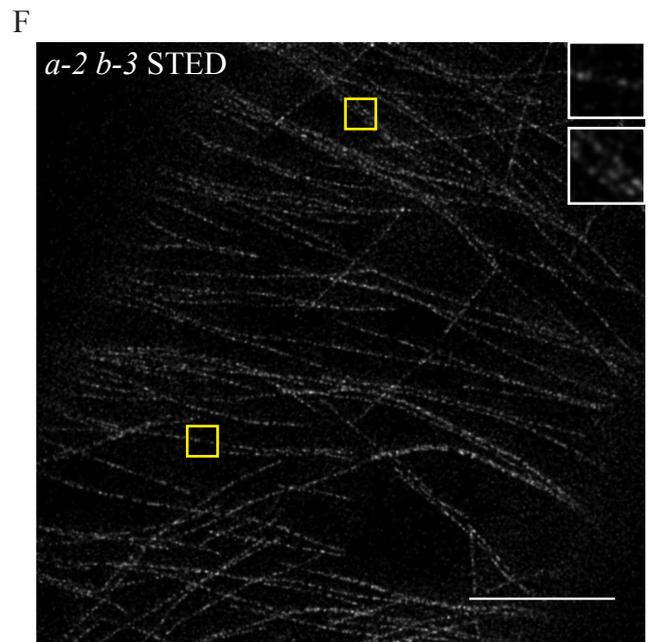
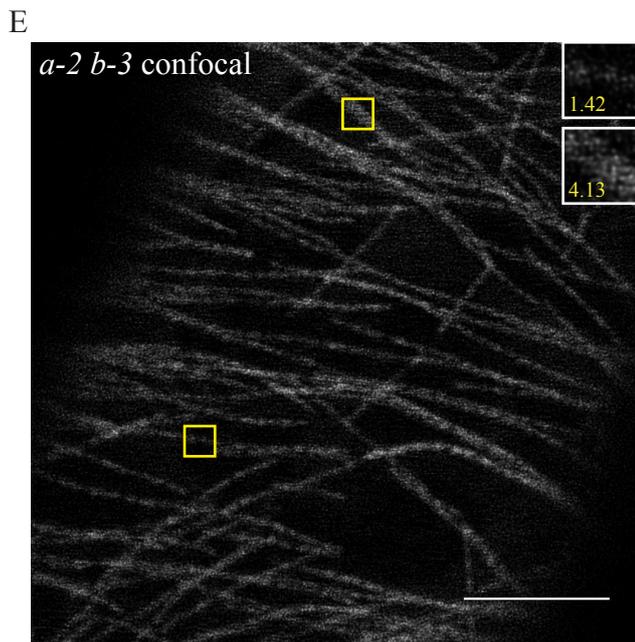
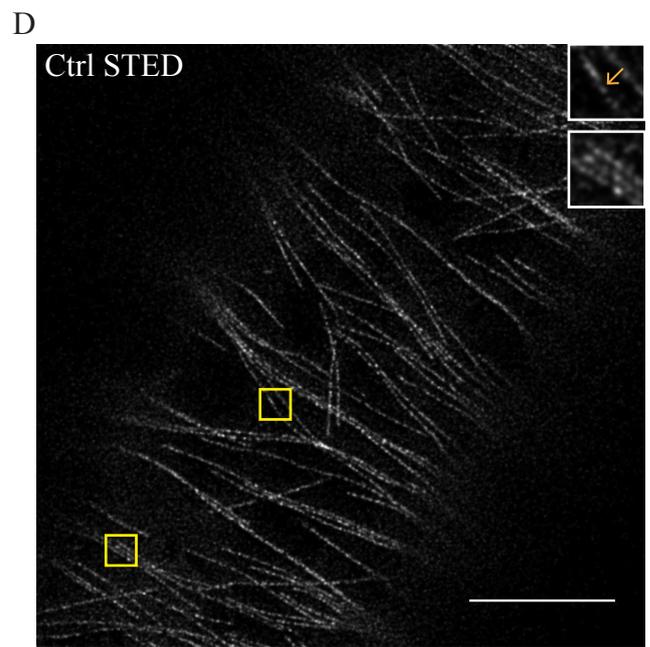
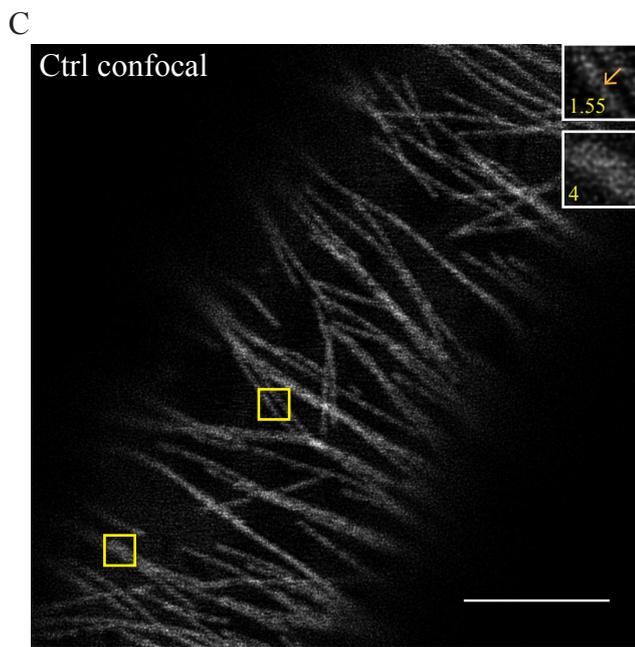
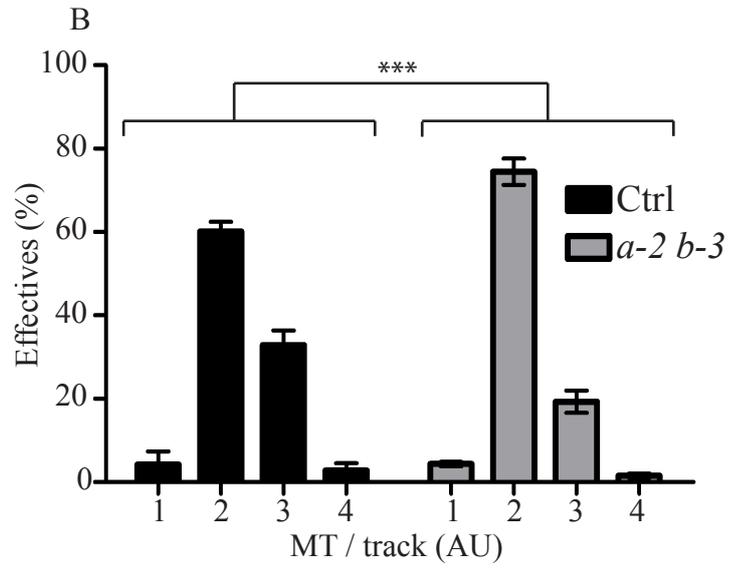
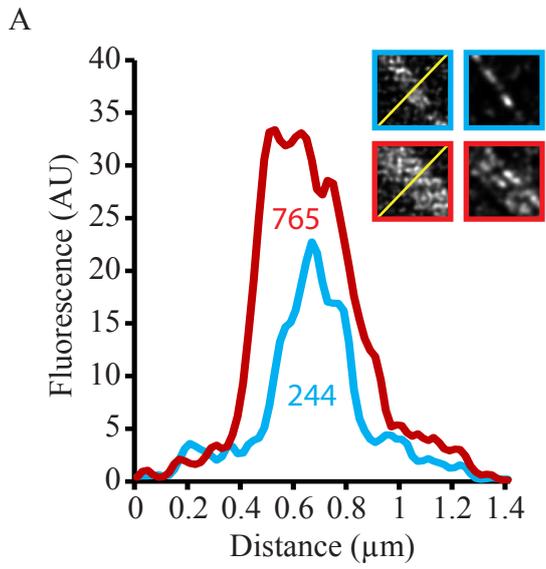
(**A**) Characteristic pictures illustrating the increase of root skewing and shortening as a function of the medium hardness for control and *eb1a-2 eb1b-3* double-mutant plants (both expressing 35S::GFP:TuA6). Scale bar, 1 cm. (**B**) Measurement of the root length as a function of the medium hardness. n=93/90/98 for the control and n=76/95/86 for the double mutant. Letters represent statistically significant differences (t-test, $\alpha=0.01$). (**C**) Measurement

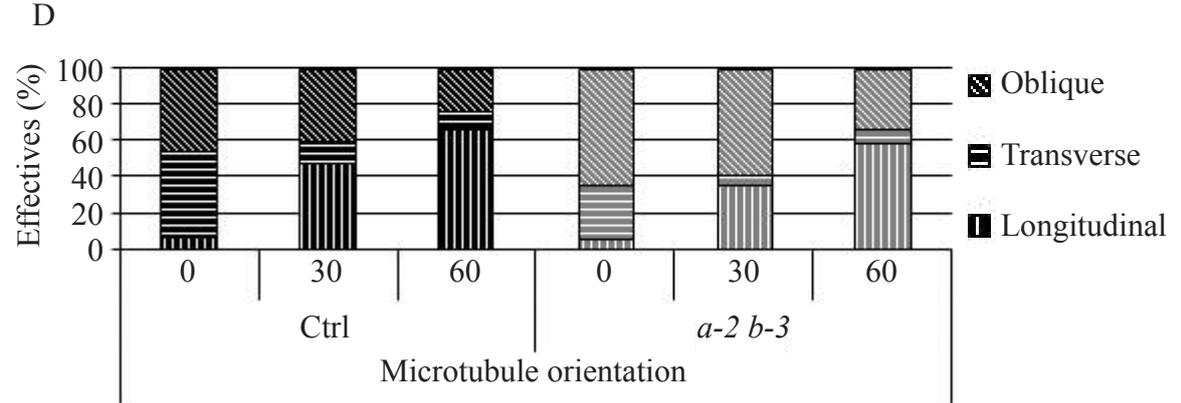
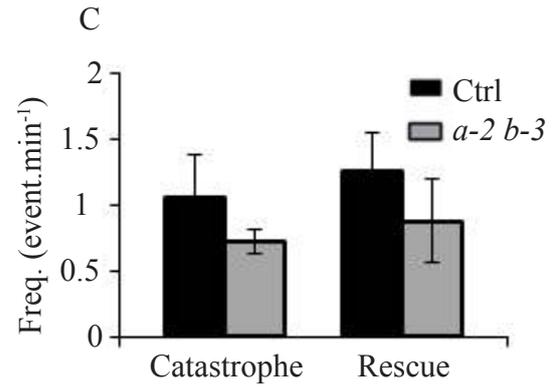
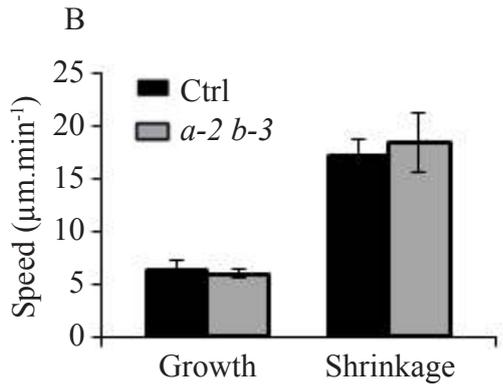
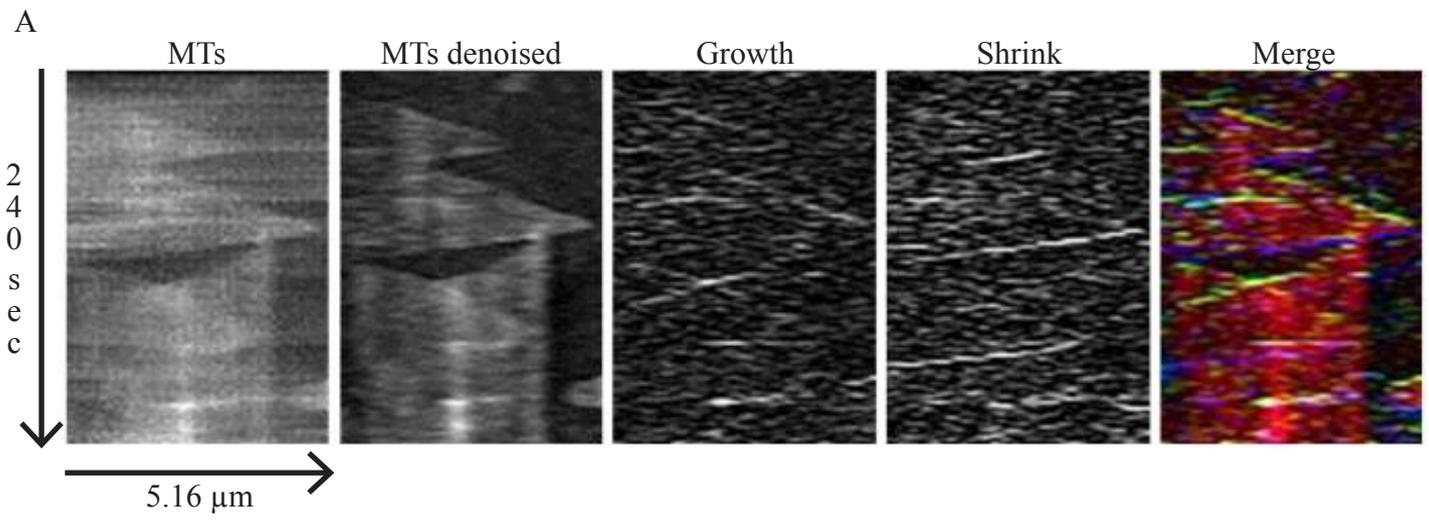
of the root-skewing angle as a function of the medium hardness. Positive and negative angle represent rightward and leftward deviation respectively. n=89/96/103 for the control and n=84/91/90 for the double mutant. Letters represent statistically significant differences (t-test, $\alpha=0.01$).

Figure 5: AtEB1a and AtEB1b may contribute to the gravitropism/thigmotropism balance, through the maintenance of the cortical-microtubule network integrity: a model

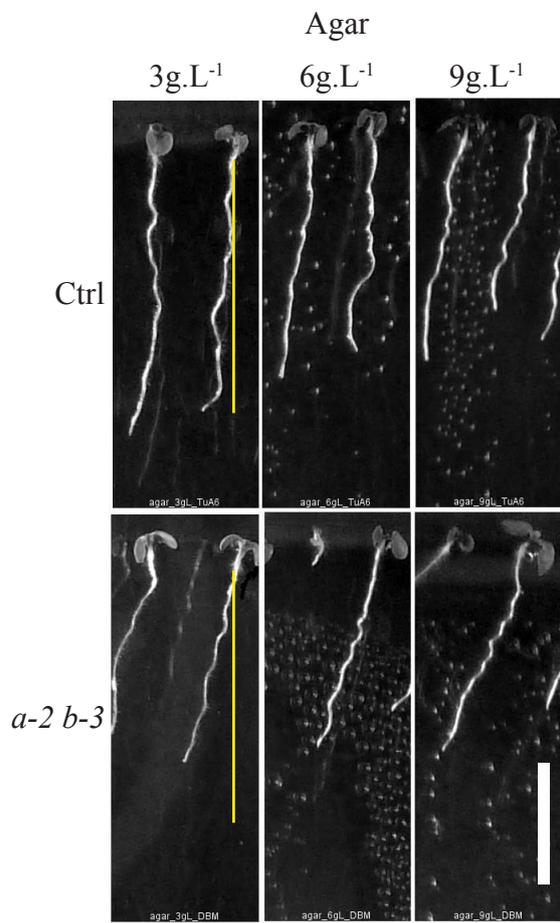
When roots undergo a mechanical stimulation, plants respond as a function of the stimulation strength. In plants lacking AtEB1a and AtEB1b, the microtubule network is disorganized (more isotropic with fewer bundles), so as a weak mechanical stimulation leads to an “avoidance” response while the same stimulation leads to a “gravitropic” response in wild type. At the whole-plant level, this exaggerated thigmotropism response combined with circumnutation gives rise to skewed roots.



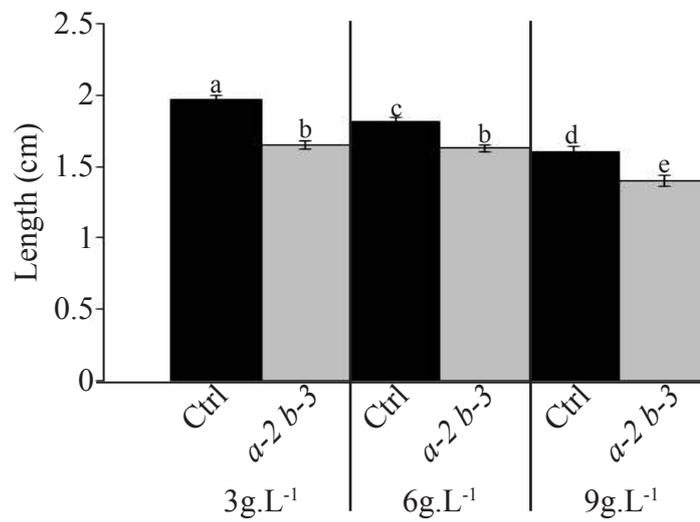




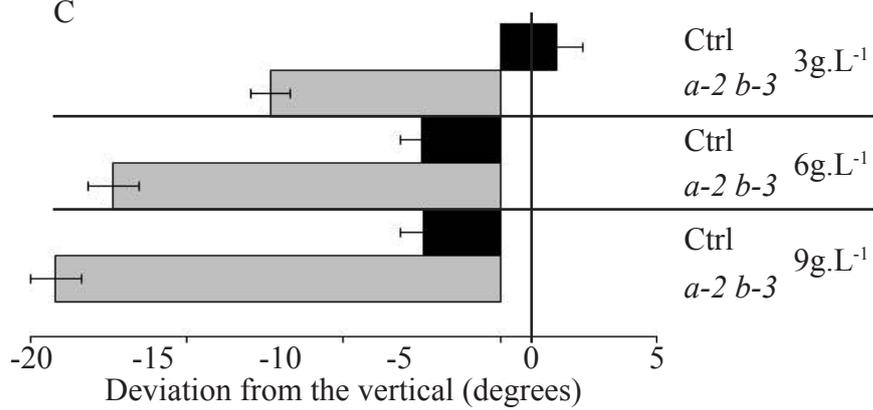
A



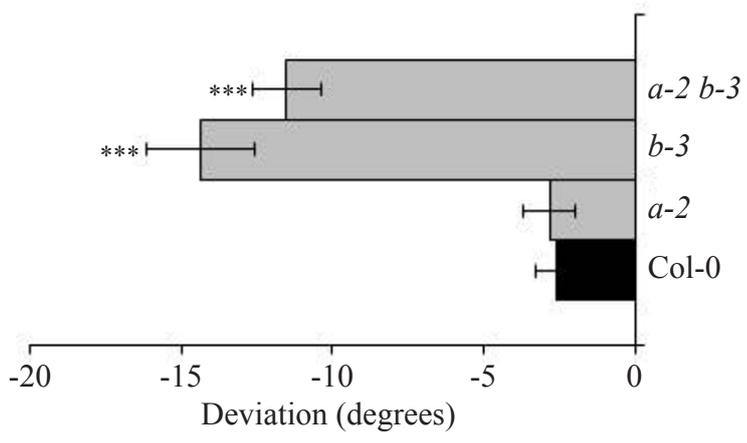
B



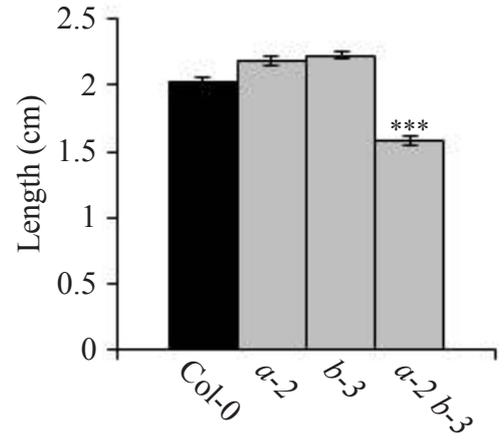
C

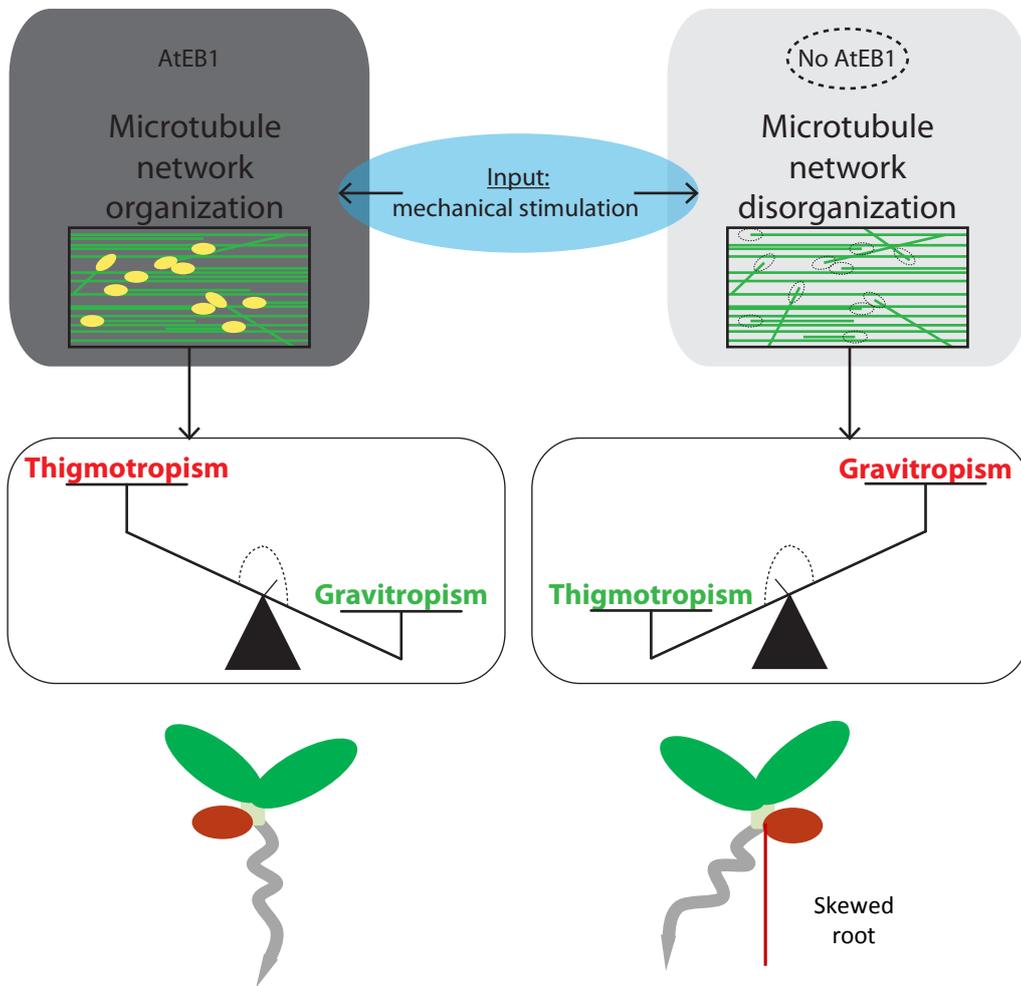


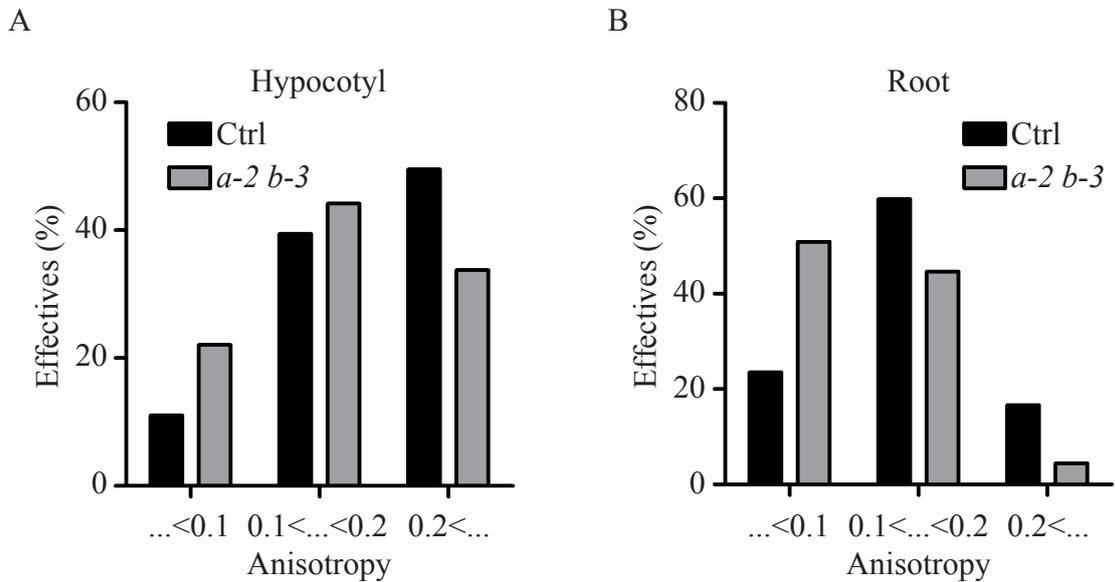
A



B

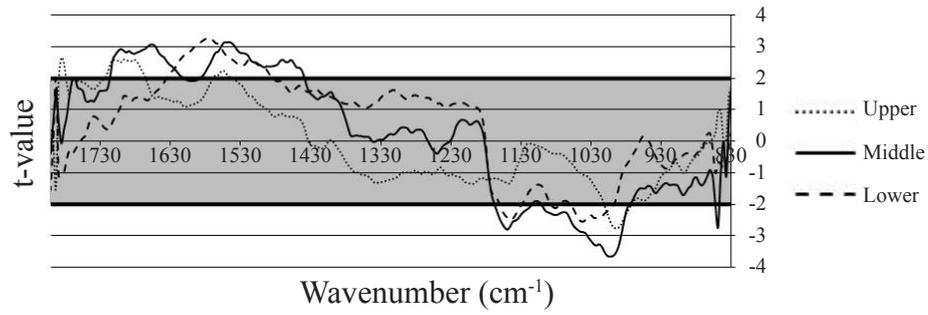






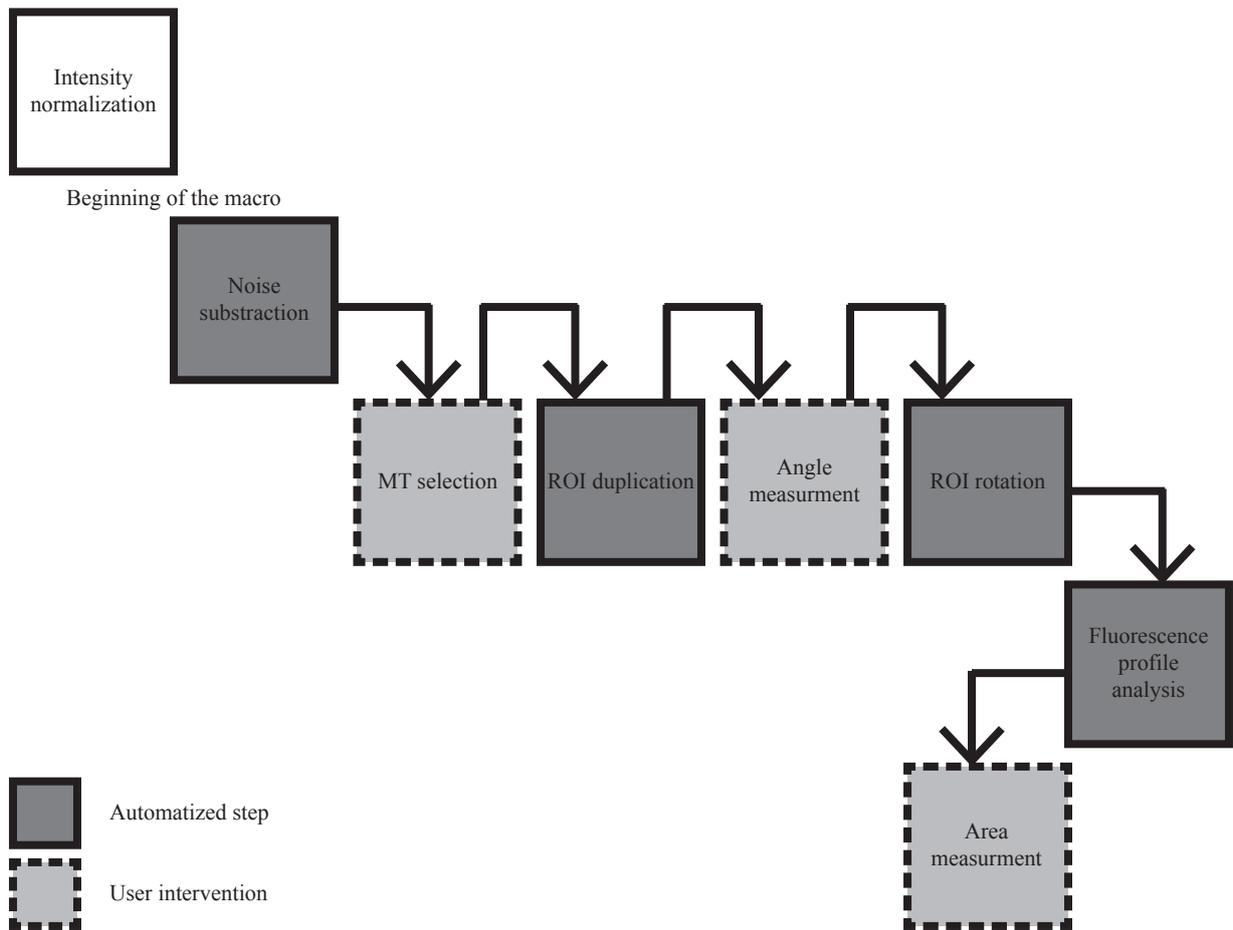
Supplementary Figure 1: Frequency distribution of anisotropy

Frequency distribution of the anisotropy value in control and double-mutant cells (growing hypocotyl (A) and root cells (B)). The population is clearly enriched with small values of anisotropy in the double mutant. MT network anisotropy in etiolated-hypocotyl cells (A) and in root cells (B) for both control (n=109 and n=132) and *eb1a-2 eb1b-3* (n=77 and n=112) genotypes.

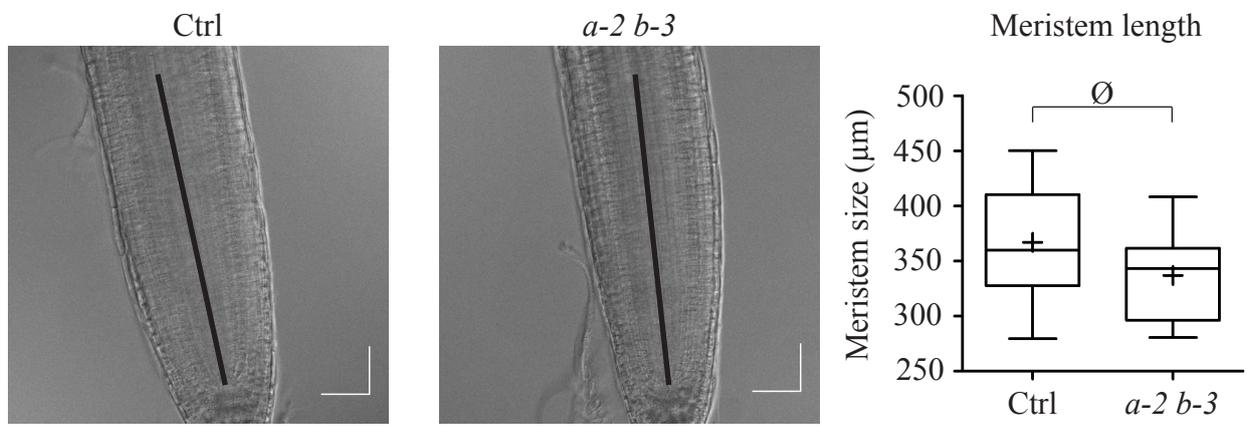


Supplementary Figure 2: FT-IR spectra comparison between wild type (Col0) and *eb1a-2 eb1b-3* plants

Student's t test: t-value for the comparison between wild type (Col-0) and *eb1a-2 eb1b-3* FT-IR spectra obtained in the upper, middle and bottom parts of growing hypocotyl, plotted against the wavenumber (x-axis) n=20.



Supplementary Figure 3: Workflow of the semi-automated approach designed for bundling quantification.



Supplementary Figure 4: Root apical meristem length

Root apical meristem from Col-0 (A) and double mutant (B) after 7 day of growth on 0.3% agar medium. Box-plot (C) showing the root apical meristem length in Col-0 and double mutant. The length was measured from the quiescent center to the beginning of the elongation zone. Crosses represent the mean, bars represent the median and whiskers indicate minima and maxima. $n=17$ and 14 for Col-0 and double mutant respectively. Difference is not significant according to a t-test with $\alpha=0.01$. Scale bar = 50 μm

Acronym	Line	Mutation	Ecotype	Source
<i>a-2</i>	<i>eb1a-2</i>	tDNA	Columbia 0	[35]
<i>b-3</i>	<i>eb1b-3</i>	SNP	Columbia 0	[35]
<i>a-2 b-3</i>	<i>eb1a-2 eb1b-3</i> 35S::GFP::TuA6	tDNA SNP	Columbia 0	[35]
Control	35S::GFP::TuA6	tDNA	Columbia 0	[69]

Supplementary Table I: Recap chart of plant lines used in the present study

	Ctrl	<i>a-2 b-3</i>
V_g (μm.min⁻¹)	5.25 (1.42) n = 158	5.61 (1.63) n = 125
V_s (μm.min⁻¹)	-16.48 (8.05) n = 93	-16.02 (12.30) n = 64
F_{cat} (μm.min⁻¹)	0.776 n = 93	0.659 n = 64
F_{res} (μm.min⁻¹)	1.152 n = 20	0.928 n = 13
Growth time (sec)	7725.8	5825.5
Growth length (μm)	675.55	545.15
Shrinkage time (sec)	1041.4	840.17
Shrinkage length (μm)	286.08	224.30
MT number	158	125
Plant number	8	8

Supplementary Table II: Parameters of microtubule dynamic instability in control and *eb1a-2 eb1b-3* double mutant plants (both expressing 35S::GFP::TuA6).

Values have been cumulated here from all measured trajectories, whereas Figure 3 indicates averaged values from 8 plants.

**Annexe 2 : Script ImageJ « Estimation du nombre de microtubule par faisceau
V1 »**

Normalisation
des
histogrammes

Début de la macro

Retrait du
bruit

Selection
d'un MT

Duplication
d'une ROI

Mesure de
l'angle

Rotation de
la ROI

Tracer du
profil de
fluorescence

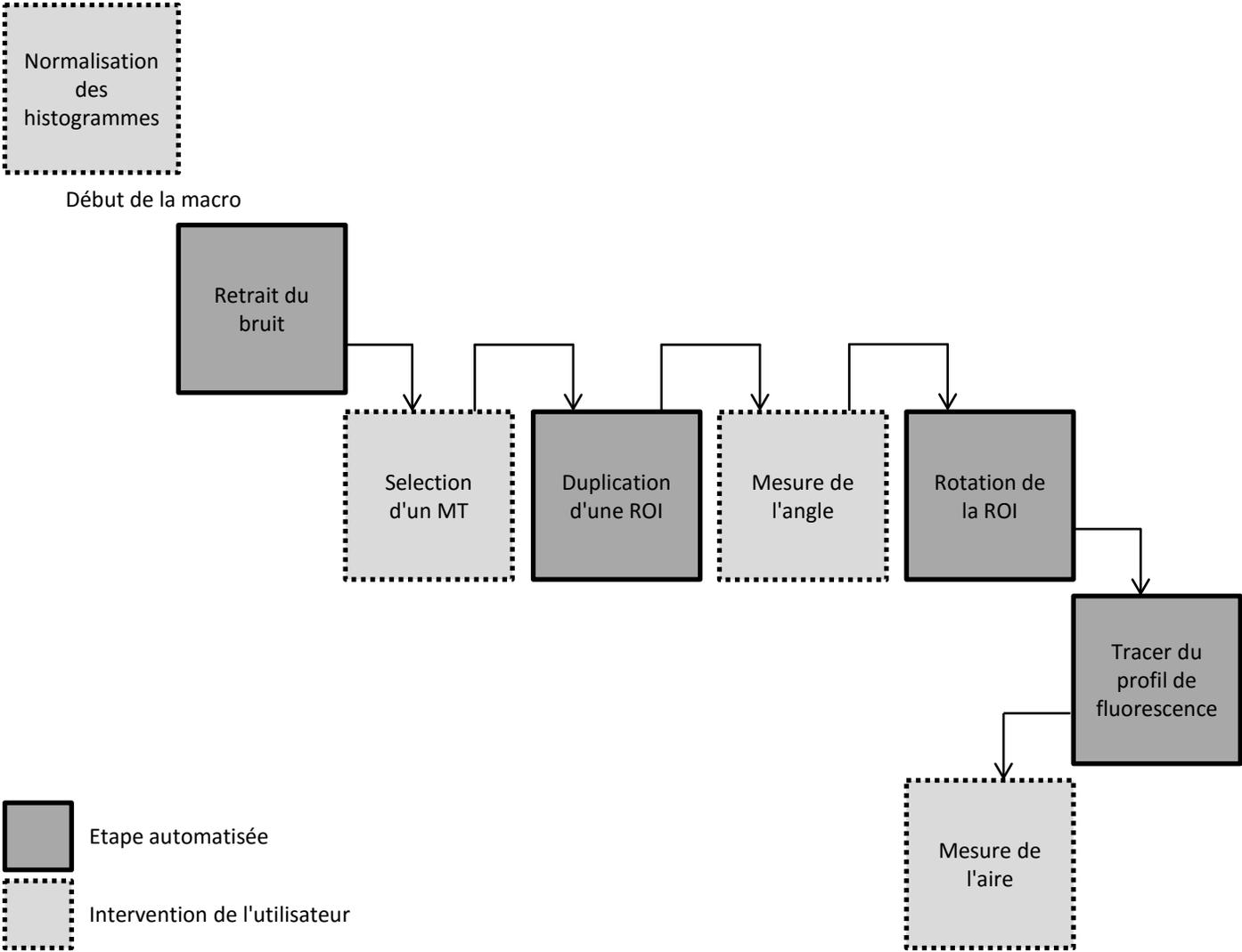
Mesure de
l'aire



Etape automatisée



Intervention de l'utilisateur



```

run("Close All");
print("\\\\Clear");
name="Calculated_Surfaces";
name = name + ".xls";

open("");
Pic_Nam =File.name;
Pic_Name = Pic_Nam + ".tif";

Dir_out = getDirectory("Choose out-put directory");

//Créer les différents listes pour les sauvegardes

Angles=newArray(10);
Surfaces=newArray(10);
Bruit=newArray(3);
MoyBruit=newArray(1);

//Estimer le bruit de fond

    getStatistics(area, mean, min, max, std, histogram);
    a=std;
    IJ.deleteRows(0, 1);

    selectWindow(Pic_Nam);
    run("Subtract...", "value=a");

for (i=0; i<=10; i++)
{

    //découper la portion de MT à analyser

    selectWindow(Pic_Nam);
    makeRectangle(0, 0, 50, 50);
    setTool("rectangle");
    waitForUser("Déplacer le rectangle pour sélectionner MT d'interet");

    run("ROI Manager...");
    roiManager("Add");
    run("Duplicate...", "title=MT");

    setTool("zoom");
    waitForUser("zoomer à votre convenance");

    //re-orienter l'image

    // l'utilisateur trace avec l'outil angle, l'angle entre le MT et
l'horizontale

    setTool("angle");

    waitForUser("Tracer angle entre MT et horizon");

```

```

//l'utilisateur click sur OK

//La valeur de l'angle est entrée dans l'array Angles

run("Measure");
Angles[i]=getResultString("Angle", 0);

//obtenir la taille de l'image

e=getHeight();
f=getWidth();
g=2*f;
h=2*e;

//L'image est re-orientée

run("Canvas Size...", "width=g height=h position=Center zero");
z=Angles[i];
run("Rotate... ", "angle=z grid=1 interpolation=Bilinear");
saveAs("Tiff", Dir_out+i);

//Tracer la selection pour faire le plot profil

j=getHeight();
k=getWidth();
l=k/4;

m=k/2;

makeRectangle(l, 0, m, j);
run("Select First Lane");
run("Plot Lanes");

//Traçage d'une droite sur le plot

setTool("line");
waitForUser("Trcer ligne pour délimiter zone à mesurer");

//Mesure de la surface sous la courbe

setTool("wand");
waitForUser("Cliquer sous la courbe");

//Sauvegarde des aires

Surfaces[i]=getResultString("Area", 0);

Array.show(Surfaces);

Dialog.create("Continuer la macro ?");
Dialog.addCheckbox("Yes", false);

```

```

Dialog.addCheckbox("No",false);

Dialog.show();
ch1=Dialog.getCheckbox();
ch2=Dialog.getCheckbox();

    if (ch1==false)
    if (ch2==false)
        {
            for (t=0; t<10; t++)
            {
                print(Surfaces[t]);
            }
            selectWindow("Log");
            saveAs("Text", Dir_out+name);
            //roiManager("Save", Dir_Out+Pic_Name);
            exit();
        }

    if (ch1==true)
    if (ch2==true)
        {
            for (t=0; t<10; t++)
            {
                print(Surfaces[t]);
            }
            selectWindow("Log");
            saveAs("Text", Dir_out+name);
            //roiManager("Save", Dir_Out+Pic_Name);
            exit();
        }

    if (ch1==false)
    if (ch2==true)
        {
            for (t=0; t<10; t++)
            {
                print(Surfaces[t]);
            }
            selectWindow("Log");
            saveAs("Text", Dir_out+name);
            //roiManager("Save", Dir_Out+Pic_Name);
            exit();
        }

    if (ch1==true)
    if (ch2==false)
        {
            wait(500); }
}

```


**Annexe 3 : Script ImageJ « Estimation du nombre de microtubule par faisceau
V2 »**

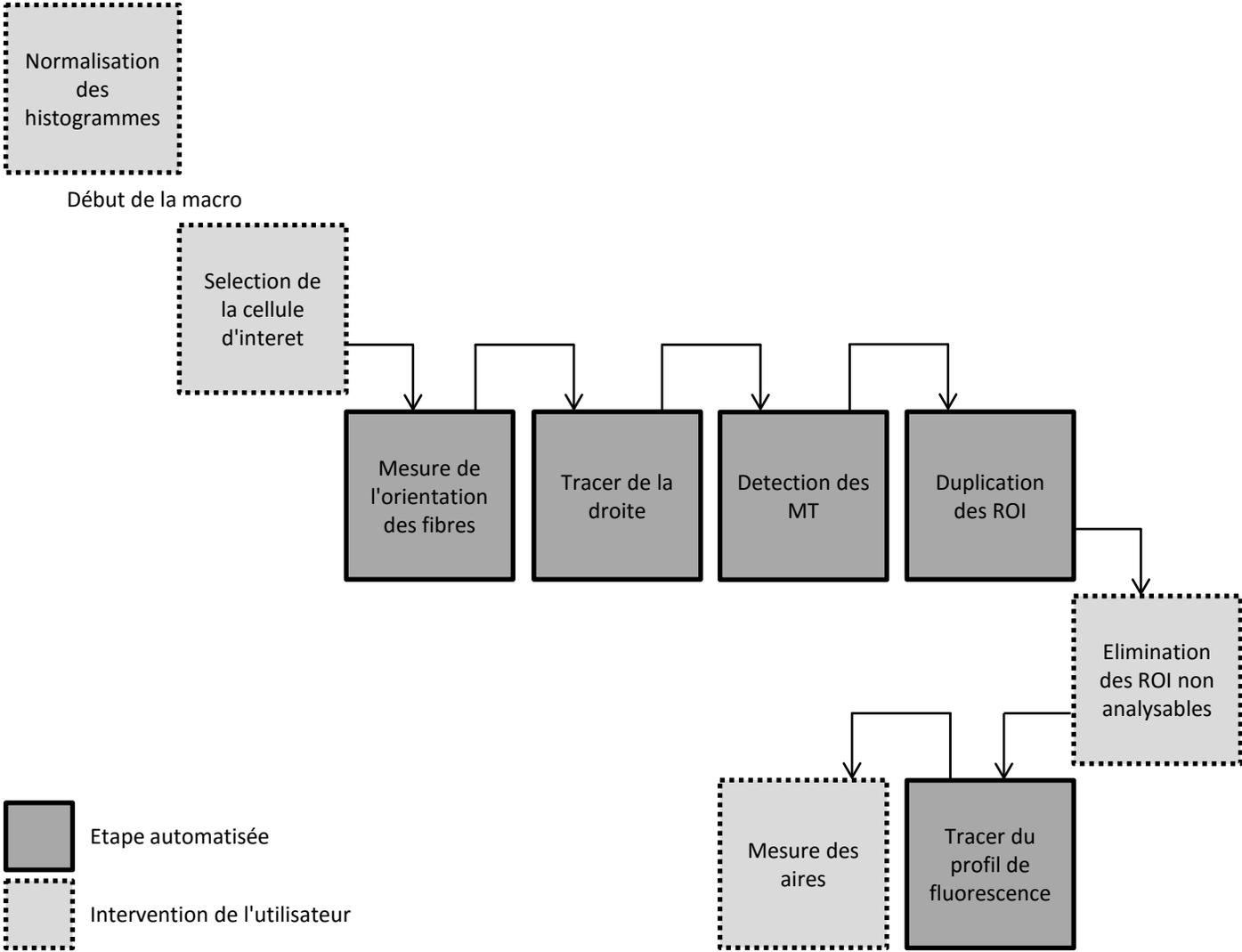


Début de la macro



 Etape automatisée

 Intervention de l'utilisateur



```

open(""); //Choisir l'image
Name =File.name; //Garder le nom de l'image
SavedName = Name + ".tif";
Dir_out = getDirectory("Choose out-put directory");//Choix du dossier de
sortie

    //Extraire la cellule d'interet
    //L'utilisateur dessine les bords de la cellule, l'exterieur est
fixé à 0, l'image est cropée

setTool("polygon");
waitForUser("Click OK when contour of the cell are drawn");
run("Colors...", "foreground=white background=black selection=red");
run("Clear Outside");
run("Crop");
run("ROI Manager...");
roiManager("Add");
roiManager("Deselect");

    //Trouver l'angle moyen des MTs
    //La selection précédente est réutilisée pour faire l'analyse avec
FibrilTool

selectWindow(Name);
run("Duplicate...", "title=FB"); //L'image est dupliquée pour l'analyse
avec FibrilTool
selectWindow("FB");
roiManager("Select", 0);

//_____
_____
//Début du code extrait de FibrilTool, Boudahoud et al.2014
//...

// scaling factor for drawing of segments
var norm_constant;

//threshold for flat regions
var thresh = 2;

// numbering of cells
var num;

//defaults for drawing
var fib="G";
var drw="B";
norm_constant =1;

//default for font sizeroiManager("Select", 0);
roiManager("Deselect");
roiManager("Delete");
var fsize = 15;

```

```

//default for width of lines
var lwidth = 2;

var pi = 3.14159265;

//if ( (fib != "R") && (fib != "G") && (fib != "B") )
//  exit("Select channel for fibrils \nPlease double-click on the
tool");

//if (selectionType()==-1)
//  exit("Selection required !");
id = getImageID();
title = getTitle();

getPixelSize(unit, pixelWidth, pixelHeight);
//if (pixelWidth != pixelHeight) exit("Rectangular pixels!");
scale = pixelWidth;

setBatchMode(true);

//properties of selection
num++;
selectImage(id);
getSelectionCoordinates(vertx, verty);
c = polygonCentre(vertx, verty);
c0s = c[0]*scale;
c1s = c[1]*scale;
getRawStatistics(area);
areas = area*scale*scale;
pr = 2;
sortie = title+"\t"+num;
sortie = sortie+"\t"+d2s(c0s, pr)+"\t"+d2s(c1s, pr)+"\t"+d2s(areas, pr);

//extract fibril signal
selectImage(id);
run("Duplicate...", "title=Temp");
run("Crop");
getSelectionCoordinates(vertxloc, vertyloc);
if (fib == "R") setRGBWeights(1,0,0);
    else if (fib == "G") setRGBWeights(0,1,0);
    else if (fib == "B") setRGBWeights(0,0,1);
    else exit("Fibril color undefined");
run("8-bit");

//compute x-gradient in "x"
selectWindow("Temp");
run("Duplicate...", "title=x");
run("32-bit");
run("Translate...", "x=-0.5 y=0 interpolation=Bicubic");
run ("Duplicate...", "title=x1");
run("Translate...", "x=1 y=0 interpolation=None");

```

```

imageCalculator("subtract","x","x1");
selectWindow("x1");
close();

//compute y-gradient in "y"
selectWindow("Temp");
run ("Duplicate...", "title=y");
run("32-bit");
run("Translate...", "x=0 y=-0.5 interpolation=Bicubic");
run ("Duplicate...", "title=y1");
run("Translate...", "x=0 y=1 interpolation=None");
imageCalculator("subtract","y","y1");
selectWindow("y1");
close();

//compute norm of gradient in "g"
selectWindow("x");
run("Duplicate...", "title=g");
imageCalculator("multiply","g","x");
selectWindow("y");
run("Duplicate...", "title=gp");
imageCalculator("multiply","gp","y");
imageCalculator("add","g","gp");
selectWindow("gp");
close();
selectWindow("g");
w = getWidth(); h = getHeight();
for (y=0; y<h; y++) {
    for (x=0; x<w; x++){
        setPixel(x, y, sqrt( getPixel(x, y)));
    }
}
//set the effect of the gradient to 1/255 when too low ; threshold =
thresh
selectWindow("g");
for (y=0; y<h; y++) {
    for (x=0; x<w; x++){
        if (getPixel(x,y) < thresh)
            setPixel(x, y, 255);
    }
}

//normalize "x" and "y" to components of normal
imageCalculator("divide","x","g");
imageCalculator("divide","y","g");

//compute nxx
selectWindow("x");
run("Duplicate...", "title=nxx");
imageCalculator("multiply","nxx","x");
//compute nxy
selectWindow("x");

```

```

run("Duplicate...", "title=nxy");
imageCalculator("multiply", "nxy", "y");
//compute nyy
selectWindow("y");
run("Duplicate...", "title=nyy");
imageCalculator("multiply", "nyy", "y");

//closing
selectWindow("Temp");
close();
selectWindow("x");
close();
selectWindow("y");
close();
selectWindow("g");
close();

//averaging nematic tensor
selectWindow("nxx");
makeSelection("polygon", vertxloc, vertyloc);
getRawStatistics(area, xx);
close();
selectWindow("nxy");
makeSelection("polygon", vertxloc, vertyloc);
getRawStatistics(area, xy);
close();
selectWindow("nyy");
makeSelection("polygon", vertxloc, vertyloc);
getRawStatistics(area, yy);
close();

//eigenvalues and eigenvector of texture tensor
m = (xx + yy) / 2;
d = (xx - yy) / 2;
v1 = m + sqrt(xy*xy + d*d);
v2 = m - sqrt(xy*xy + d*d);
//direction
tn = - atan((v2 - xx) / xy);
//score
scoren = abs((v1-v2) / 2 / m);

//output
tsn=tn*180/pi;
// nematic tensor
sortie = sortie+"\t"+d2s(tsn,pr)+"\t"+d2s(scoren, 2*pr);

//polygon coordinates
np = vertx.length;
for (i=0; i<np; i++){
xp = vertx[i]; yp = verty[i];
sortie = sortie+"\t"+d2s(xp,pr)+"\t"+d2s(yp,pr);
}

```

```

//
//print output
//print(sortie);

//
//drawing of directions and cell contour
setBatchMode(false);
selectImage(id);
run("Add Selection...", "stroke=yellow width="+lwidth);

// drawing nematic tensor
if ( drw != "No" ) {
u1 = norm_constant*sqrt(area)*cos(tn)*scoren + c[0];
v1 = - norm_constant*sqrt(area)*sin(tn)*scoren + c[1];
u2 = - norm_constant*sqrt(area)*cos(tn)*scoren + c[0];
v2 = norm_constant*sqrt(area)*sin(tn)*scoren + c[1];
if (drw == "R") stroke = "red";
    else if (drw == "G") stroke = "green";
    else if (drw == "B") stroke = "blue";
    else exit("Drawing color undefined");
makeLine(u1,v1,u2,v2);
run("Add Selection...", "stroke="+stroke+" width"+lwidth);
}

//print number at center
selectImage(id);
//makeText(num,c[0],c[1]);
run("Add Selection...", "stroke="+stroke+" font="+fsize+" fill=none");

//restore original selection
makeSelection("polygon",vertx,verty);

setTool("polygon");
//end macro

// centroid of a polygon
function polygonCentre(x,y){
    n =x.length;
    areal = 0;
    xc = 0; yc = 0;
    for (i=1; i<n; i++){
        inc = x[i-1]*y[i] - x[i]*y[i-1];
        areal += inc;
        xc += (x[i-1]+x[i])*inc;
        yc += (y[i-1]+y[i])*inc;
    }
    inc = x[n-1]*y[0] - x[0]*y[n-1];
    areal += inc;
    xc += (x[n-1]+x[0])*inc;
}

```

```

        yc += (y[n-1]+y[0])*inc;
        areal *= 3;
        xc /= areal;
        yc /= areal;
        return newArray(xc,yc);
    }

//distance between two points (x1,y1) et (x2,y2)
function distance(x1,y1,x2,y2) {
    return sqrt((x1-x2)*(x1-x2)+(y1-y2)*(y1-y2));
}

//...
//Fin du code extrait de FibrilTool
//_____
_____

//La valeur de l'angle moyen est utilisée pour faire pivoter l'image

selectWindow(Name);
run("Rotate... ", "angle=tsn grid=1 interpolation=Bilinear fill enlarge");

selectWindow("FB"); //Le duplicata utilisé pour l'analyse avec
FibrilTool est fermé
close();

//On estime le bruit avec le STD
//Le STD est mesuré et sauvegardé dans une variable

selectWindow(Name);
getStatistics(area, mean, min, max, std, histogram);
STD=std;

//On supprime le bruit de fond
// -STD

selectWindow(Name);
run("Duplicate...", "title=For_plot");
selectWindow("For_plot");
run("Subtract...", "value=STD stack");

//On utilise un filtre gaussien

selectWindow("For_plot");
run("Gaussian Blur...", "sigma=3");

//Dimensions

selectWindow("For_plot");
W=getWidth();

```

```

H=getHeight();

W1=W+50;
H1=H+50;

    //Augmentation du canvas
    //De cette façon les bordes de l'image sont à 0 en intensité

selectWindow("For_plot");
run("Canvas Size...", "width=W1 height=H1 position=Center zero");

    //Positionez la droite verticale
    //La droite passe par le milieu (verticalement) de l'image

a=W1/2;
b=H1/2;
w=floor(a);
h=floor(b);

    //Creer les differents array

PlotFluo=newArray(H); //Contiendra les valeurs de fluo le long de la
ligne
Lim1=H-1;
Deriv1=newArray(Lim1); //Contiendra le resultat de la premiere dérivée
Lim2=Lim1-1;
Deriv2=newArray(Lim2); //Contiendra le resultat de la seconde dérivée

Pics=newArray(Lim2); //Positions des pics en y le long de la ligne
Trous=newArray(Lim2); //Positions des creux en y le long de la ligne

    //Rentrer le profil dans une array
    //Le profil d'intensite est fait dans l'image seuillee

selectWindow("For_plot");

makeLine(w, 0, w, H, 50);

run("ROI Manager...");
roiManager("Add");
roiManager("Save", Dir_out+"Plot.zip");

PlotFluo=getProfile();

    //Calcul du signe de la premiere derivee locale
    //y(i+1)-y(i)=Diff
    //Diff>0 => positive slop => derivel=1
    //Diff<0 => negative slop => derivel=3
    //Diff=0 => flat slop => derivel=0

CounterPics=0;
CounterTrous=0;

for (k=1; k<Lim1; k++)

```

```

{
K=k-1;
v2=PlotFluo[k];
v1=PlotFluo[K];
Diff=v2-v1;

if (Diff>0)
    {
    Deriv1[k]=1;
    }
if (Diff<0)
    {
    Deriv1[k]=3;
    }
if (Diff==0)
    {
    Deriv1[k]=0;
    }
}

//Calcul du signe de la deuxieme derivee locale
//y(i+1)-y(i)=Diff
//Diff=2 => Max
//Diff=-2 => Min
//Diff=-3/-1/0/1/3 => descente vers plat / montée vers plat / plat /
plat vers montée / plat vers descente

for (l=1; l<Lim2; l++)
    {
    L=l-1;
    v2=Deriv1[l];
    v1=Deriv1[L];
    Diff=v2-v1;

    if (Diff==2)
        {
        Deriv2[l]=2;
        Pics[l]=1;
        CounterPics=CounterPics+1;
        }
    if (Diff==-2)
        {
        Deriv2[l]=-2;
        Trous[l]=1;
        CounterTrous=CounterTrous+1;
        }
    if (Diff==0)
        {
        Deriv2[l]=0;
        }
    }
}

```

```
        //Tri et coupe dans les arrays pour garder uniquement les valeurs
d'interets
```

```
Array.sort(Pics);
Array.sort(Trous);
```

```
SliceStart=Lim2-CounterPics;
SliceEnd=Lim2-CounterTrous;
```

```
MAX=Array.slice(Pics, SliceStart, Lim2);
//Array.show(MAX);
```

```
MIN=Array.slice(Trous, SliceEnd, Lim2);
//Array.show(MIN);
```

```
        //Tracer des selections
        //Les selections sont centrees sur le MT d'interet et font 100 pxls
de haut
```

```
//Tracer de la selection 0
```

```
//selectWindow(Name);
//Ypos=MIN[0];
//l=MIN[1]-MIN[0];
//makeRectangle(w-25, Ypos, 50, 1);
//run("ROI Manager...");
//roiManager("Add");
//run("Duplicate...", "title=Max_0");
```

```
//Tracer les selections 1 a i-1");
```

```
Zstop=CounterPics-1;
```

```
for (z=1; z<Zstop; z++)
{
    selectWindow(Name);
    Z=z-1;
    l=MIN[z]-MIN[Z];
    Ypos=MIN[Z];
    makeRectangle(w-25, Ypos, 50, 1);
    run("ROI Manager...");
    roiManager("Add");
    run("Duplicate...", "title=Max_"+z+"");
}
```

```
//Tracer de la derniere selection
```

```
selectWindow(Name);
```

```
Zzstop=Zstop-1;
Ypos=MIN[Zzstop];
```

```

F=Zstop-1;
l=MIN[Zzstop]-MIN[F];
makeRectangle(w-25, Ypos, 50, l);
run("ROI Manager...");
roiManager("Add");
run("Duplicate...", "title=Max_"+Zstop+"");

roiManager("Save", Dir_out+"ROI.zip");

    //Sauvegarde des images

selectWindow(Name);
saveAs("Tiff", Dir_out+Name+".tif");
run("Close");

selectWindow("For_plot");
saveAs("Tiff", Dir_out+"For_Plot.tif");
run("Close");

    //Verification des ROIs
    //L'utilisateur ferme les ROIs non conforme

run("Tile");

waitForUser("Close ROIs that doesn't fit for the analysis then click OK
");

    //Les images ROIs contenant 1 seul MT horizontal sont mise dans un
stack.

run("Images to Stack", "name=Stack title=[] use");

nbSlices=nbSlices;
sliceW=getWidth();
sliceH=getHeight();

for(m=1; m<=nbSlices; m++)
{
    selectWindow("Stack");
    setSlice(m);
    makeRectangle(0, 0, sliceW, sliceH);
    run("Select First Lane");
    run("Plot Lanes");
    //L'utilisateur dessine la ligne basale permettant de calculer l'air
sous la courbe
    waitForUser("Draw line to delimit the peak");
    selectWindow("Plots of Stack");
    rename("Plots of "+m+"");
}

```

```
}
```

```
run("Tile");
```

```
Area=newArray(nbSlices);
```

```
for(n=1; n<=nbSlices; n++)
```

```
{
```

```
    selectWindow("Plots of "+n+");
```

```
    setTool("wand");
```

```
    //L'utilisateur sous chaque courbe pour en mesurer l'air
```

```
    waitForUser("Click under the peak of interest");
```

```
    N=n-1;
```

```
    Area[N]=getResultString("Area", 0);
```

```
    run("Clear Results");
```

```
    selectWindow("Plots of "+n+");
```

```
    saveAs("Tiff", Dir_out+Name+"Plot_of_"+n+".tif");
```

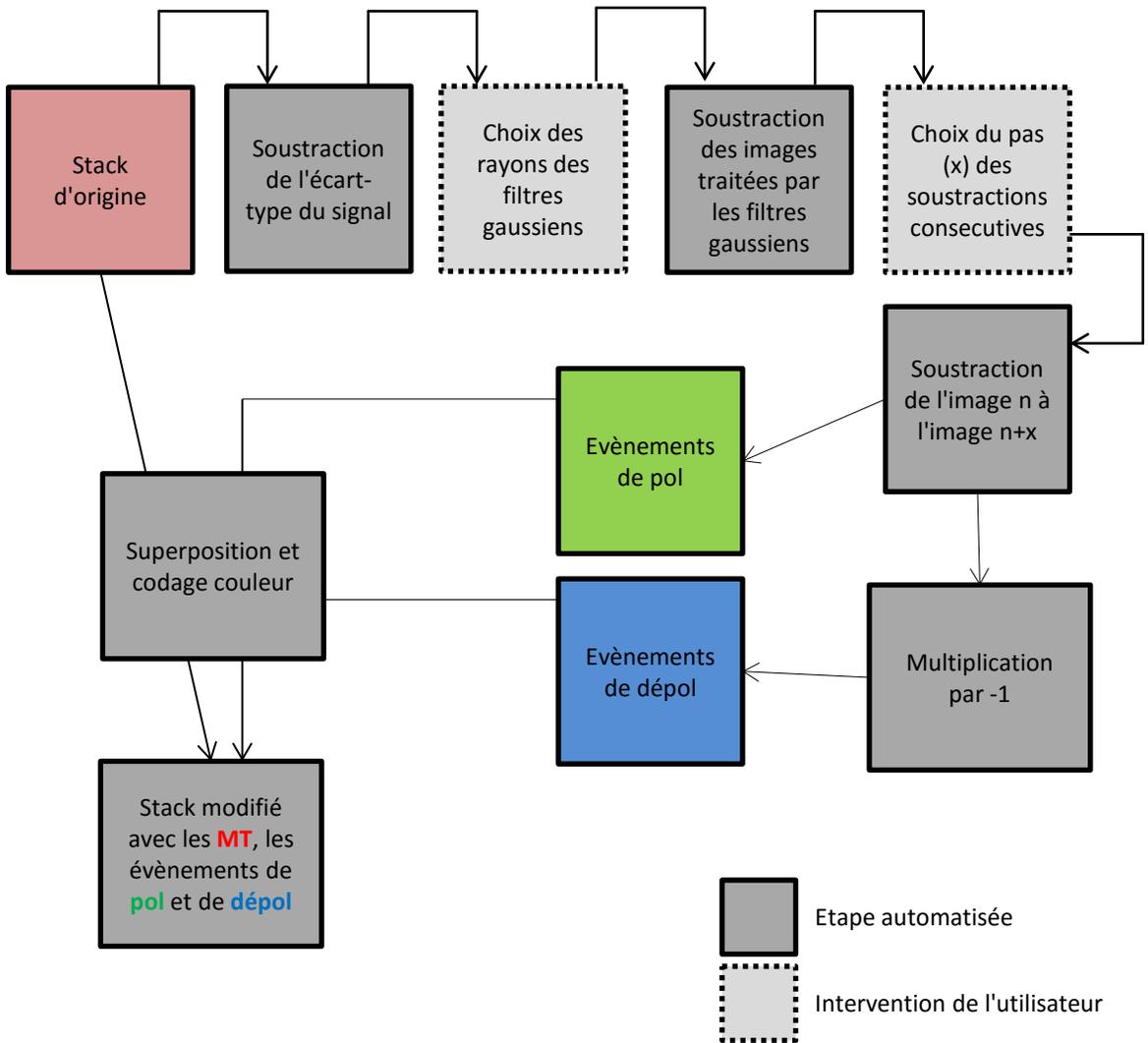
```
}
```

```
saveAs("Tiff", Dir_out+Name+"stack.tif");
```

```
selectWindow("Stack");
```

```
Array.show(Area);
```


Annexe 4 : Script ImageJ « Soustraction des images consécutives »



```

open("");
Name_origin = getTitle();
Dir_out = getDirectory("Choose out-put directory");

setBatchMode(true);

run("Stack to Images");
run("Images to Stack", "name=Stack title=[]");

setBatchMode(false);

                                //Passer le stack en 32 bit

z = bitDepth();
if(z<32) run("32-bit");

                                //Normaliser le stack

run("Enhance Contrast...", "saturated=0.4 normalize process_all");

                                //Choix des slices d'intéret

title = "select slice of interest";

msg1 = "select first slice of interest";
waitForUser(title, msg1);
a = getSliceNumber();

wait(500);

msg2 = "select last slice of interest";
waitForUser(title, msg2);
b = getSliceNumber();

                                //Duplication des slices d'interet

run("Duplicate...", "title=Stack_"+a+"-"+b+" duplicate range=a-b");
selectWindow("Stack_"+a+"-"+b+"");
Name_stack = getTitle();

                                //Duplication du stack pour faire la DoG

run("Duplicate...", "title=DoG_sup duplicate range=1-end");
selectWindow(Name_stack);
run("Duplicate...", "title=DoG_inf duplicate range=1-end");

                                //Choix des radius pour les filtres gaussien

Dialog.create("DoG parameters");
Dialog.addNumber("Radius Sup",4);
Dialog.addNumber("Radius Inf",2);
Dialog.show();

```

```

rSup=Dialog.getNumber();
rInf=Dialog.getNumber();

//Application des filtres gaussiens

selectWindow("DoG_sup");
run("Gaussian Blur...", "sigma=rSup stack");
selectWindow("DoG_inf");
run("Gaussian Blur...", "sigma=rInf stack");

//Soustraction des stacks

imageCalculator("Subtract create 32-bit stack", "DoG_inf", "DoG_sup");
rename("MTs");
selectWindow("DoG_inf");
close();
selectWindow("DoG_sup");
close();

//Calibration du pas des soustractions

Dialog.create("Step size");
Dialog.addNumber("n+",1);
Dialog.show();
z=Dialog.getNumber();

y =nSlices-z;
x =1+z;

//Soustraction des images n aux images n+Z

selectWindow("MTs");
run("Duplicate...", "title=n duplicate range=1-y");
selectWindow("MTs");
run("Duplicate...", "title=n+z duplicate range=x-nSlices()");

imageCalculator("Subtract create 32-bit stack", "n+z", "n");
selectWindow("n");
close();
selectWindow("n+z");
close();
selectWindow("Stack");
close();

//Sauvegarde des pols

selectWindow("Result of n+z");
getDimensions(width, height, channels, slices, frames);
nbs=slices;
run("Duplicate...", "title=TIPS_Pol duplicate range=1-nbs");
Name_compol = getTitle();
saveAs("Tiff", Dir_out+Name_compol);

//Création et sauvegarde des dépols

```

```

selectWindow("Result of n+z");
run("Duplicate...", "title=TIPs_Depol duplicate range=1-nbs");
selectWindow("TIPs_Depol");
run("Multiply...", "value=-1.000 stack");
Name_compo2 = getTitle();
saveAs("Tiff", Dir_out+Name_compo2);

                                //Sauvegarde des MTs

selectWindow(Name_stack);
saveAs("Tiff", Dir_out+Name_stack);

selectWindow("MTs");
rename("MTs1");
Name_MTs1 = getTitle();

                                //Création et sauvegarde des merges

selectWindow("MTs1");
getDimensions(width, height, channels, slices, frames);
nbs2=slices;
run("Duplicate...", "title=MTs duplicate range=2-nbs2");
Name_MTs2 = getTitle();
saveAs("Tiff", Dir_out+Name_MTs2);
run("Merge Channels...", "c1=MTs.tif c2=TIPs_Pol.tif c3=TIPs_Depol.tif
create keep");
selectWindow("Composite");
rename("MTs_Pol_Depol");
Name_compo3 = getTitle();
saveAs("Tiff", Dir_out+Name_compo3);

run("Close All");

```


Annexe 5 : Prédiction de l'interaction entre EB1 b et MAP65-1 d'après ANAP

Titre : Organisation du Réseau Cortical de Microtubules chez *Arabidopsis thaliana* : Contribution des protéines EB1 et MAP65-1.

Mots clés : Microtubules, EB1, MAP65-1, tropismes, microscopie

Les cellules végétales possèdent un réseau de microtubule hautement organisé impliqué dans le développement et l'adaptation aux contraintes environnementales. Toutefois, les mécanismes moléculaires permettant l'organisation de ce réseau restent à élucider. La protéine EB1 (End-Binding 1) participe à la croissance directionnelle de la racine d'*Arabidopsis thaliana* bien qu'aucun lien avec le réseau de microtubule n'ait été démontré jusqu'ici.

Nos résultats démontrent le rôle de la protéine EB1 dans l'organisation du réseau cortical de microtubules dans les cellules épidermiques en élongation, ce rôle n'impliquant pas de modification de l'instabilité dynamique des microtubules. L'utilisation de la microscopie à super-résolution (STED) a permis la mise en évidence d'une diminution du nombre de microtubules dans les faisceaux de microtubules en absences des protéines EB1 cytoplasmiques ce qui suggère le rôle de ces protéines dans la formation de ces derniers. De plus, les racines des mutants de EB1 présentent une déviation de la racine ainsi qu'une hypersensibilité à la dureté du milieu. Ces résultats signalent l'existence d'un lien entre l'architecture du réseau cortical et le sens du toucher.

Le lien entre la formation de faisceaux de microtubules et l'organisation du réseau a été examiné plus en détails par la recherche des tels phénotypes dans le mutant de MAP65-1/PRC1/ASE1, cette protéine étant bien connue pour sa capacité à former faisceaux de microtubules. Il est apparu que le réseau de microtubule est désorganisé dans ce mutant alors que le nombre de faisceaux de microtubules y est également réduit.

Nous avons ensuite étudié les propriétés intrinsèques de la protéine EB1-b sur la dynamique des microtubules ainsi que la possibilité d'une action synergique de EB1-b et MAP65-1 sur la formation de faisceaux de microtubules *in vitro* en utilisant un système acellulaire purifié. La protéine EB1 animale promeut la dynamique des microtubules alors que la protéine végétale semble avoir l'effet inverse. L'ensemble de nos résultats suggère un modèle dans lequel EB1 contribue contribuerait à la maintenance de l'organisation du réseau cortical de microtubules ainsi qu'à la formation des faisceaux, ces fonctions impliquant la protéine dans la régulation de la balance entre thigmotropisme et gravitropisme.

Title: Cortical Microtubules Network Organization in *Arabidopsis thaliana*: Contribution of EB1 and MAP65-1 proteins

Keywords: Microtubules, EB1, MAP65-1, tropismes, microscopy

In plants, microtubules form a highly organized network involved in development and adaptation to their environment but the molecular mechanisms sustaining the overall network organization remain elusive. Microtubule-End-Binding 1 (EB1) proteins participate in directional root growth in *Arabidopsis thaliana*. However, a connection to the underlying microtubule array has not been established yet.

We show here that EB1 proteins contribute to the organization of cortical microtubules in growing epidermal plant cells, without strongly modulating microtubule dynamics. Using super-resolution STED microscopy, we also demonstrate a significant reduction of the microtubule bundling activity in cytoplasmic-EB1-deficient plants, suggesting a role of those proteins in microtubule nucleation or zipping. Furthermore, we observed root growth defects along with a hypersensitivity to medium hardness in EB1-deficient plants, indicating a link between microtubule array architecture and mechanical sensing.

To further explore the link between microtubule bundling and microtubule network organization we have analyzed those phenotypes in a mutant of MAP65-1/PRC1/ASE1, a protein well known for its role in microtubule bundling. It appears that the microtubule network is disorganized in this mutant while the number of bundles is reduced.

We then assessed the intrinsic function of EB1-b on microtubule dynamic instability and also the possible cooperativity of EB1-b and MAP65-1 in bundle formation using *in vitro* cell free system. While mammalian EB1 promotes microtubule dynamicity, plant EB1-b seems to have the opposite effect. Altogether, our results support a model that EB1 proteins contribute to the maintenance of the microtubule network organization and microtubule bundling, thus, being involved in the balance between thigmotropism and gravitropism.