



# Caractérisation du rôle de TBCE et MAP7 dans l'assemblage du fuseau mitotique

Mathieu Métivier

## ► To cite this version:

Mathieu Métivier. Caractérisation du rôle de TBCE et MAP7 dans l'assemblage du fuseau mitotique. Biologie du développement. Université Rennes 1, 2019. Français. NNT : 2019REN1B037 . tel-03483509v1

**HAL Id: tel-03483509**

**<https://theses.hal.science/tel-03483509v1>**

Submitted on 16 Dec 2021 (v1), last revised 16 Dec 2021 (v2)

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

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

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605  
*Biologie Santé*  
Spécialité : « *Biologie Cellulaire, Biologie du développement* »

**Par Mathieu MÉTIVIER**

## Caractérisation du rôle de TBCE et MAP7 dans l'assemblage du fuseau mitotique

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 21 octobre 2019  
Unité de recherche : UMR6290, CNRS – Université de Rennes 1

### Rapporteurs avant soutenance :

**Isabelle ARNAL**  
DR2 CNRS  
Institut des Neurosciences, Grenoble

**Julien DUMONT**  
DR2 CNRS  
Institut Jacques Monod, Paris

### Composition du Jury :

**Serge HARDY** Président  
Professeur  
IGDR, Rennes

**Isabelle ARNAL** Rapporteur  
DR2 CNRS  
Institut des Neurosciences, Grenoble

**Julien DUMONT** Rapporteur  
DR2 CNRS  
Institut Jacques Monod, Paris

**Marie Hélène VERLHAC** Examinateur  
DR1 CNRS  
Collège de France, Paris

**Régis GIET** Directeur de thèse  
DR2 CNRS  
IGDR, Rennes



## **Remerciements**

Je tiens tout d'abord à remercier Julien Dumont et Isabelle Arnal d'avoir accepté de juger mes travaux ainsi que Marie-Hélène Verlhac de faire partie de ce jury. Merci également à Serge Hardy d'avoir accepté de le présider.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse, Laurence Duschesne, Franck Chesnel, Gwenaël Rabut et Pascale Le Goff pour leurs conseils scientifiques.

Je souhaite bien entendu en premier lieu remercier toute l'équipe CCP.

Merci à mon directeur de thèse, Régis (ou plutôt chef) de m'avoir accueilli dans son équipe. Que ce soit au niveau professionnel ou personnel, ta sympathie, ton enthousiasme et ta disponibilité font que j'ai pu m'épanouir scientifiquement à tes côtés. Je te souhaite le meilleur pour ton équipe.

Je remercie aussi la seconde personne qui dirige cette équipe et qui me supporte dans son bureau depuis trois années, notre technicienne exceptionnelle, Aude. Nos discussions sur le tennis vont me manquer. Qui te donnera les astuces pour regarder les matchs de Federer pendant les grands chelems maintenant ? J'espère que tu vas enfin pouvoir profiter de ton bureau seule quelques temps.

Mes remerciements vont également à Laurent pour sa pertinence et sa grande patience lors de la relecture du manuscrit. Par contre, je ne te remercie pas de m'avoir donné la pire note de ma scolarité.

Christelle, merci pour ta bonne humeur et tes conseils mais aussi de m'avoir fait confiance pour notre collaboration, nos discussions me manqueront.

Je n'oublie pas mes deux acolytes Alexandre et Manu, j'espère que vos travaux avanceront comme vous le souhaitez et surtout ne changer pas, c'était top ces deux dernières années en votre compagnie. J'espère que mes conseils pour le babyfoot porteront leurs fruits et que vous deviendrez les meilleurs de l'institut.

Encore merci à toute cette équipe avec qui ces quatre années sont passées à une vitesse folle. Au delà du travail, il y a dans cette équipe une vraie solidarité et amitié qu'il sera dur de retrouver ailleurs (en particulier le vendredi matin).

Ensuite je tiens à remercier Renaud, qui a été présent pour les premières manips. J'ai beaucoup appris en quelques mois grâce à ta patience et ta rigueur.

Merci à toute l'équipe +TIPs que ce soit Denis, Romain, Siou et Laurence (encore) pour leurs aides dans les manips mais surtout pour les bons moments passés en congrès.

Un grand merci à tous les anciens thésards et les membres de l'IGDR présents ou passés.

Merci à tous les copains, en particulier la team P, ma seconde famille, que je traîne depuis que j'ai appris à marcher pour la plupart : Cécé, le Bull, les Tibora, Gégé et Crète. Je n'oublie pas la bande d'Alençon, tous des copains en or sans qui les soirées seraient moins festives.

Pour maman et papa à qui j'ai dit un jour « Après l'IUT j'arrête !!! ». Bon les études ont été un peu plus longues que prévues. Sans votre éducation et votre soutien je ne serais pas là aujourd'hui. A Mathilde, ma sœur, la personne la plus altruiste et généreuse que je connaisse, je suis très fier de ce que tu es devenue. Une pensée va à mes grands-parents, les personnes les plus bienveillantes que j'ai rencontré.

Je garde le meilleur pour la fin. Pour toi Margaux (la pepette), merci d'être à mes côtés, chaque jour je vois tout ce que tu fais pour moi, pour nous (en particulier ces dernières semaines). Cette période est enfin terminée et je suis pressé de savoir ce que le futur nous réserve.

En navigation, comme en sciences, voilà finalement le plus excitant : douter sans arrêt, se tromper parfois, errer, mais... arriver !

*Eric Karsenti*

## **Introduction :**

## **Le mécanisme d'assemblage du fuseau mitotique ..... 1**

## **I. La composition du fuseau mitotique ..... 3**

|       |                                                                                                                               |    |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I.A   | Le microtubule .....                                                                                                          | 3  |
| I.A.1 | Structure du microtubule .....                                                                                                | 3  |
| I.A.2 | Formation de l'hétérodimère de tubuline .....                                                                                 | 5  |
| a)    | Les premières étapes du repliement conformationnel de la tubuline .....                                                       | 5  |
| b)    | Les cofacteurs de la tubuline .....                                                                                           | 5  |
| c)    | Arl2 .....                                                                                                                    | 6  |
| d)    | TBCE .....                                                                                                                    | 7  |
| e)    | La dérégulation du repliement conformationnel de l'hétérodimère de tubuline est impliquée dans des pathologies humaines ..... | 8  |
| I.A.3 | L'hétérogénéité de la tubuline : isotypes et modifications post-traductionnelles .....                                        | 9  |
| a)    | Les isotypes de la tubuline .....                                                                                             | 9  |
| b)    | Les modifications post-traductionnelles de la tubuline.....                                                                   | 11 |
| b1)   | Les principales modifications post-traductionnelles.....                                                                      | 11 |
| b2)   | Le rôle des modifications post-traductionnelles.....                                                                          | 12 |
| I.A.4 | La cinétique d'assemblage de la tubuline .....                                                                                | 12 |
| a)    | La nucléation spontanée .....                                                                                                 | 12 |
| b)    | La nucléation avec matrice .....                                                                                              | 13 |
| c)    | La nucléation sans $\gamma$ -TuRC .....                                                                                       | 13 |
| I.A.5 | Les propriétés dynamiques des microtubules .....                                                                              | 15 |
| a)    | L'instabilité dynamique des microtubules.....                                                                                 | 15 |
| b)    | La coiffe-GTP.....                                                                                                            | 15 |
| I.B   | Le centrosome.....                                                                                                            | 17 |
| I.B.1 | Structure.....                                                                                                                | 17 |
| I.B.2 | Le Cycle du centrosome .....                                                                                                  | 18 |
| I.B.3 | Le PCM (Matériel Péri-centriolaire) .....                                                                                     | 18 |
| a)    | Introduction .....                                                                                                            | 18 |
| b)    | L'assemblage du PCM au travers de la transition de phase .....                                                                | 19 |

|                                                                                              |                  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| b1) Concept de la transition de phase.....                                                   | 19               |
| b2) Le PCM mitotique .....                                                                   | 19               |
| <b><u>II. L'assemblage du fuseau mitotique .....</u></b>                                     | <b><u>21</u></b> |
| II.A Les voies de nucléation non centrosomales .....                                         | 23               |
| II.A.1 Les voies de nucléation des microtubules médiée par la chromatine .....               | 25               |
| a) Le gradient Ran-GTP.....                                                                  | 25               |
| a1) Introduction.....                                                                        | 25               |
| a2) Ran-GTP dans l'assemblage du fuseau mitotique .....                                      | 27               |
| b) Le complexe chromosome-passager (CPC) .....                                               | 28               |
| II.A.2 La voie d'amplification Microtubules-dépendante.....                                  | 29               |
| II.B Les MAPs (Microtubule Associated Proteins).....                                         | 31               |
| II.B.1 Les MAPs agissant à l'extrémité (+) des microtubules .....                            | 31               |
| a) Les dépolymérase.....                                                                     | 31               |
| b) Les polymérase.....                                                                       | 33               |
| c) Les +TIPs (+ end Tacking proteins) .....                                                  | 35               |
| c1) Les domaines et motifs des +TIPs impliqués dans la régulation de<br>l'extrémité (+)..... | 35               |
| c2) L'organisation des +TIPs.....                                                            | 36               |
| II.B.2 Les MAPs agissant à l'extrémité (-) .....                                             | 38               |
| II.B.3 Les MAPs clivant les microtubules .....                                               | 38               |
| II.B.4 Les MAPs séquestrant les dimères de tubulines .....                                   | 39               |
| II.B.5 Les moteurs moléculaires .....                                                        | 39               |
| a) La séparation des centrosomes.....                                                        | 39               |
| b) La morphologie du fuseau mitotique.....                                                   | 41               |
| c) Les chromokinésines .....                                                                 | 41               |
| II.C La « spindle matrix » .....                                                             | 43               |
| II.C.1 La compartimentation durant la mitose.....                                            | 43               |
| II.C.2 La composition protéique de la « spindle matrix ».....                                | 45               |
| II.C.3 La mise en place de la « spindle matrix » .....                                       | 46               |

## **III. Le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique**

### **49**

|                                                |    |
|------------------------------------------------|----|
| III.A Les différents types d'attachement ..... | 49 |
|------------------------------------------------|----|

|                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| III.B Les Kinétochores et le SAC.....                                            | 51        |
| III.B.1 L'ultrastructure du kinétochore et sa liaison avec les microtubules..... | 51        |
| III.B.2 La régulation du SAC par le kinétochore .....                            | 51        |
| <b><u>IV.Contexte et objectifs.....</u></b>                                      | <b>53</b> |

## **Résultats**

### **I. Étude du rôle de dTBCE dans l'assemblage du fuseau**

#### **mitotique.....**

|                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I.A Introduction .....                                                                                                                                  | 59 |
| I.B Matériels et méthodes .....                                                                                                                         | 60 |
| I.B.1 Constructions ADN.....                                                                                                                            | 60 |
| I.B.2 Lignées de drosophile utilisées .....                                                                                                             | 61 |
| II.B.3 Expression et purification de la protéine recombinante .....                                                                                     | 62 |
| II.B.4 Anticorps .....                                                                                                                                  | 62 |
| II.B.5 Western Blot .....                                                                                                                               | 63 |
| II.B.6 Culture cellulaire S2 .....                                                                                                                      | 63 |
| II.B.7 Analyse d'immunofluorescence.....                                                                                                                | 63 |
| II.B.8 Microscopie en temps réelle .....                                                                                                                | 64 |
| II.B.9 Immunoprécipitation .....                                                                                                                        | 65 |
| II.B.10 Spectrométrie de masse.....                                                                                                                     | 65 |
| a) Digestion des protéines sur billes .....                                                                                                             | 65 |
| b) Analyse LC-MS/MS.....                                                                                                                                | 66 |
| c) Recherche dans la base de données.....                                                                                                               | 67 |
| d) Annotation fonctionnelle.....                                                                                                                        | 67 |
| e) Modélisation du réseau de protéines.....                                                                                                             | 68 |
| I.C Résultats.....                                                                                                                                      | 68 |
| I.C.1 La protéine dTBCE est nécessaire pour l'assemblage du fuseau mitotique.....                                                                       | 68 |
| I.C.2 La protéine dTBCE est nécessaire pour la polymérisation des microtubules<br>autour de la chromatine .....                                         | 69 |
| I.C.3 La protéine dTBCE endogène est localisée dans la région du fuseau mitotique<br>pendant la mitose. ....                                            | 71 |
| I.C.4 La localisation de dTBCE et la viabilité des drosophiles est dépendante de la<br>présence du motif conservé présent dans le domaine CAP-Gly. .... | 72 |

|                                                                                                                   |                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| I.C.5 La protéine dTBCE s'associe aux protéines de pores nucléaires et aux composants de la voie Ran.....         | 73                |
| I.C.6 dTBCE est essentielle pour l'accumulation de tubuline fonctionnelle dans la région du fuseau mitotique..... | 74                |
| I.D Discussion .....                                                                                              | 76                |
| I.D.1 Rôle de TBCE dans la formation de l'hétérodimère de tubuline.....                                           | 76                |
| I.D.2 Régulation spatiotemporelle de dTBCE.....                                                                   | 77                |
| I.D.3 La protéine dTBCE est essentielle pour nucléer les microtubules autour de la chromatine .....               | 78                |
| I.D.4 L'accumulation des protéines dans l'espace nucléaire dans les mitoses semi-ouvertes.....                    | 79                |
| I.D.5 Mécanisme proposé.....                                                                                      | 81                |
| I.E Figures et Légendes :.....                                                                                    | 83                |
| <b><u>II. Étude des fonctions des domaines d'Ensconsine dans les Nbs et les ovocytes de drosophiles .....</u></b> | <b><u>105</u></b> |
| II.A Introduction.....                                                                                            | 105               |
| II.B Récapitulatifs des résultats .....                                                                           | 106               |
| II.C Discussion.....                                                                                              | 131               |
| II.C.1 Ensconsine pleine longueur est essentielle pour maintenir la taille du fuseau mitotique.....               | 131               |
| II.C.2 Le recrutement de la kinésine-1 par Ensconsine.....                                                        | 132               |
| <b><u>III. Conclusion générale .....</u></b>                                                                      | <b><u>135</u></b> |
| <b><u>Annexe.....</u></b>                                                                                         | <b><u>137</u></b> |
| <b><u>Références .....</u></b>                                                                                    | <b><u>159</u></b> |

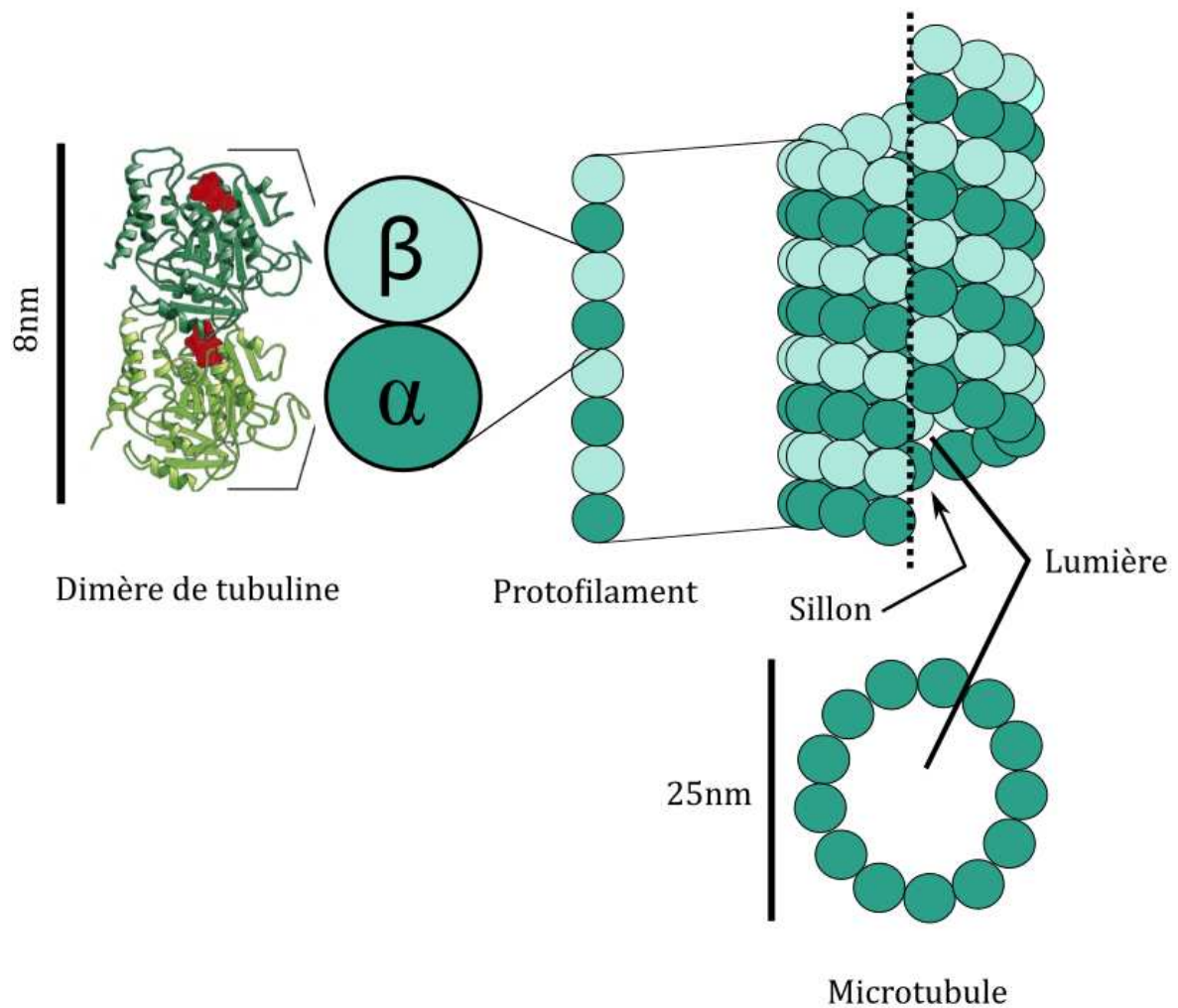
## ***Liste des abréviations***

ADN : Acide désoxyribonucléique  
APC : Anaphase promoting complex  
Arl2 : ADP ribosylation factor-like protein 2  
ARN : Acide ribonucléique  
ARNi : ARN interférence  
ARNm : ARN messenger  
ATP : Adénosine triphosphate  
Bub : Budding uninhibited by benzimidazole  
C-ter : Carboxi-terminales  
CAP-Gly : Cytoskeleton-Associated Protein Glycine Rich  
CCAN : Constitutive Centromere Associated Network  
CCPs : Carboxypeptidases Cytosoliques  
CCT : Chaperoning Containing TCP-1  
CENP : Centromeric Protein  
CH : Calponin Homology  
CIN : Chromosomal INstability  
CLASP : CLIP-170 Associated Protein  
Cnn : Centrosomine  
CPC : Chromosome Passager Complex  
COEL : Tubulin Folding Cofactor E-Like  
Dgt : Dim  $\gamma$ -tubuline  
EB1 : End-Binding 1  
Fibre k : Fibre kinétochorienne  
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer  
 $\gamma$ -TuRC :  $\gamma$ -tubulin Ring complex  
 $\gamma$ -TuSC :  $\gamma$ -tubulin small complex  
GAN : Neuropathie à axones géants  
GDP : Guanosine diphosphate  
GFP : Green Fluorescence Protein  
GTP : Guanosine triphosphate  
HAUS : Homologous to augmin subunits  
HDAC : Histone Désacétylase  
HRD : Hypoparathyroidism Retardation mental and Dysmorphism  
INCENP : INner CENtosome Protein  
KMN : Kn11/Mis12C/Ndc-80  
KNL-1 : Kinetochore null protein1  
LLPS : Séparation de Phase Liquide-Liquide  
LRR : Leucine Rich Reat  
MAPs : Microtubules Associated Proteins (ou Protéines associées aux microtubules)  
MCAK : Mitotic centromere-associated kinesin

MCRS1 : Microsherule 1  
 MCC : Mitotic Checkpoint Complex  
 MAD : Mitotic Arrest Deficient  
 Mis12C : Missegregation 12  
 Msps : Minispindle  
 MTOC : Microtubule Organizing Center ou Centre organisateur de microtubules  
 Nb : Neuroblastes larvaires de *Drosophila melanogaster*  
 Ncd-80 : Nuclear division cycle 80  
 NES : Nuclear Exportin Signal  
 NLS : Nuclear Localisation Signal  
 NPC : Nuclear Pore Complex  
 N-ter : N-terminal  
 Nup : Nucléoporine  
 OP18 : Oncoprotein 18  
 PCM : Matériel Péri-centriolaire  
 PEG : Polyéthylène Glycol  
 PFD : Préfoldine  
 Pi : Phosphate inorganique  
 Pmn : Neuropathie motrice progressive  
 PRC1 : Protein Required for Cytokinesis 1  
 Ran : Ras-related nuclear protein  
 RCC1 : Regulator of Chromosome Condensation 1  
 SAF : Spindle Assembly Factor  
 Site E : Exchangeable Site  
 SPB : Spindle Pole Bodies  
 TBC : Tubulin Binding Cofactor  
 TIRF : Total internal reflection fluorescence microscopy (ou Microscopie de fluorescence par réflexion totale interne)  
 TOG : Tumor Overexpressed Gene  
 Tpr : Translocated promoter region  
 TPX2 : Targeting protein for xenopus kinesin-like protéin 2  
 TRiC : Tailless complex polypeptide 1 ring complex  
 TTLL : Tubuline Tyrosine Ligase Like  
 UBL : Ubiquitin Binding Like Domain  
 VASH : Vasohibine  
 +TIPs : ± End Tracking Protein

## **INTRODUCTION:**

Le mécanisme d'assemblage du fuseau mitotique



**Figure 1 : Structure d'un microtubule**

À gauche, une structure cristallographique (avec sa représentation schématique) d'un hétérodimère de tubuline (unité de base du microtubule) les nucléotides sont en rouge. L'hétérodimère à une longueur de 8 nm. Ces dimères s'associent en protofilaments (au milieu). L'interaction latérale entre les 13 protofilaments (cas le plus général) va constituer un feuillet qui va se refermer sur lui même pour former un tube creux de 25 nm de diamètre, le microtubule (à droite).

## I. La composition du fuseau mitotique

Shinya Inoué démontrait en 1953 que le fuseau mitotique était constitué de fibres de protéines responsables du mouvement des chromosomes. Ces fibres que l'on appelle aujourd'hui microtubules sont, comme leur nom l'indique, des filaments microscopiques cylindriques creux. Pendant la mitose, ils s'organisent en structure bipolaire, appelée le fuseau mitotique, qui est essentiel pour la ségrégation des chromosomes entre les deux cellules filles.

### I.A Le microtubule

#### I.A.1 Structure du microtubule

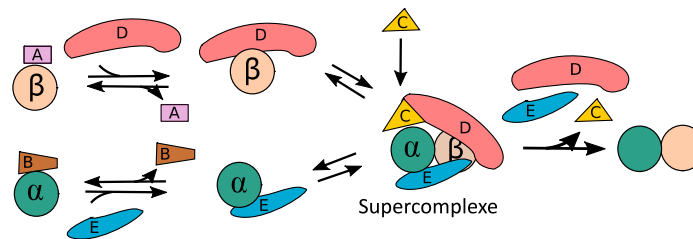
Les microtubules sont des polymères creux de 25nm de diamètre constitués d'hétérodimères d' $\alpha$ -tubuline et de  $\beta$ -tubuline, des protéines globulaires de 50KDa. L'étude de la structure tridimensionnelle de l'hétérodimère de tubuline a mis en évidence que cette architecture globulaire est composée de 12 hélices  $\alpha$  et 10 feuillets  $\beta$ . Chaque sous unité possède un site GTP, site N (Non-exchangeable) pour l' $\alpha$ -tubuline et site E (Exchangeable Site) pour la  $\beta$ -tubuline dans sa partie N-ter. Ce GTP est hydrolysable et échangeable pour la sous unité  $\beta$  (qui lie le GTP ou GDP). En revanche la sous unité  $\alpha$  lie constitutivement le GTP (Figure 1, à gauche) (Nogales et al., 1998; Nogales et al., 1999).

L'association par des liaisons non covalentes d'hétérodimères d' $\alpha\beta$ -tubulines constitue un protofilament. Cet agencement confère une polarité structurale au protofilament : l' $\alpha$ -tubuline est orientée vers l'extrémité (-) et la  $\beta$ -tubuline vers l'extrémité (+) (Mitchison 1993). Ces protofilaments s'alignent parallèlement (13 dans la plupart des cellules) en un feuillet qui va se refermer pour former le microtubule. Les protofilaments vont établir une interaction latérale avec les tubulines de même type ( $\alpha$ - $\alpha$ ,  $\beta$ - $\beta$ ) avec un décalage nommé « sillon » dans le sens de la longueur produisant une rupture de la symétrie axiale (Revue Wade et Hyman, 1997) (Figure 1). *In vitro*, le nombre de protofilaments au sein d'un microtubule peut varier de 9 à 16 (Chrétien et al., 1992; Sui and Downing, 2010).

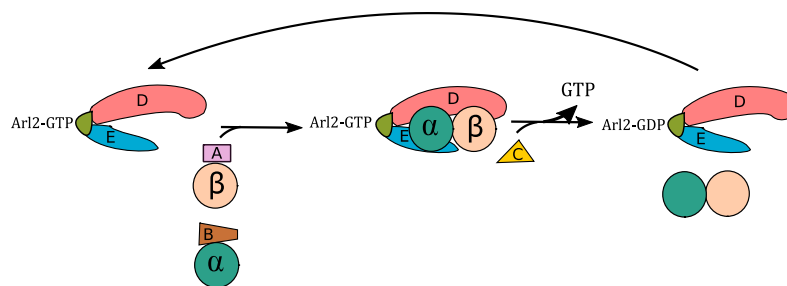
**A**

| Nom  | Symbole                                                                           | Taille  | Domaines                                                                                          |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TBCA |  | 12 KDa  |                  |
| TBCB |  | 28 KDa  |  Ubq CAP-Gly     |
| TBCC |  | 32 KDa  |  Hélice-B        |
| TBCD |  | 116 KDa |  Domaines HEAT   |
| TBCE |  | 60 KDa  |  CAP-Gly LRR Ubq |
| Arl2 |  | 25 KDa  |  GTPase          |

**B** Modèle "linéaire" de Cowan et al.



**C** Modèle "cyclique" de Nithianantham et al.



**Figure 2 : Les cofacteurs de la tubuline et Arl2**

A) Les cofacteurs de la tubuline A-E et Arl2 avec leurs tailles et les différents domaines.

B) Paradigme de formation dit « linéaire » de l'hétérodimère de tubuline (Tian et al., 1996, Cowan et al., 2013) TBCA lie la  $\beta$ -tubuline et TBCB l' $\alpha$ -tubuline. TBCA et TBCB sont ensuite remplacés par respectivement TBCD et TBCE. TBCC lie transitoirement TBCE- $\alpha$ -tubuline et TBCD- $\beta$ -tubuline formant un supercomplexe transitoire permettant la libération de l'hétérodimère.

C) Le model révisé dit « cyclique » de Nithianantham et al., ou Arl2 forme un complexe stable avec TBCE- $\alpha$ -tubuline et TBCD- $\beta$ -tubuline. TBCC participe à l'hydrolyse du GTP d'Arl2, ce qui permet de libérer le dimère de tubuline.

(inspiré de Al-Bassam, 2017)

## I.A.2 Formation de l'hétérodimère de tubuline

### a) Les premières étapes du repliement conformationnel de la tubuline

La tubuline n'est stable que sous forme d'hétérodimère  $\alpha\beta$ -tubuline. La formation de cet hétérodimère est un processus non spontané qui nécessite l'intervention séquentielle de protéines chaperonnes et de cofacteurs (Tian et al. 1995). En cas d'erreurs de repliement ou d'association, les monomères ou hétérodimères de tubuline qui ne peuvent pas être repliés par les chaperonnes moléculaires sont dégradés (Lundin et al., 2010). Pendant la phase S, les polypeptides de tubuline sont transférés par la Préfoldine au CCT (Chaperoning Containing TCP-1) (Yokota et al. 1999). Une fois que la tubuline est en contact avec le CCT, la Préfoldine se détache et ne forme à aucun moment un complexe ternaire (Vainberg et al., 1998). La Préfoldine améliore l'efficacité du repliement de la tubuline en transférant les molécules partiellement repliées vers le CCT (Millan-Zambrano et al., 2014).

Le CCT est un complexe hétéro-oligomérique en forme de tonneau composé de deux anneaux, chacun composé de 8 sous unités ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ) faisant une taille d'environ 1MDa. Ce complexe est impliqué dans le repliement de plusieurs protéines de la cellule (Willison, 2018). De nombreuses études montrent qu'une ou plusieurs étapes du repliement des monomères de tubuline sont dépendantes du CCT (Booth et al., 2008; Vallin and Grantham., 2018). En effet, le passage par le CCT est obligatoire pour les monomères de tubuline afin d'atteindre leurs formes fonctionnelles.

### b) Les cofacteurs de la tubuline

En 1990, la découverte des gènes *cin1*, *cin2*, *cin4* et *pac2* chez *Saccharomyces cerevisiae* ont été identifiés comme importants pour la mitose. Même si ces gènes sont non essentiels pour la viabilité chez la levure, des délétions induisent des défauts de ségrégation de chromosome appelé CIN (Chromosomal INstability). Dans ces mutants, les microtubules polymérisent difficilement et deviennent hyperpersensibles aux drogues contre les microtubules (Hoyt et al., 1990, Hoyt et al., 1997, Sterns et al., 1990).

Les orthologues de la levure *Rbl2*, *Alf1*, *Cin2*, *Cin1* et *Pac2* ont été identifiés plus tard chez d'autres organismes tel que *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* et *Arabidopsis thaliana* (Hirata et al., 1998, Radcliffe et al., 1999, Szymanski et al., 2002). Ces protéines ont été renommées respectivement TBCA, TBCB, TBCC, TBCD et TBCE (pour Tubulin Binding Cofactor) (Figure 2A).

Cowan et ses collègues sont les premiers, par des études biochimiques, à décrire une voie appelée « linéaire » de repliement et de formation de l'hétérodimère de l' $\alpha$  et la  $\beta$ -tubuline (Tian et al., 1996, Tian et al., 1997, Cowan Lewis., 2001). TBCB et TBCA lie respectivement l' $\alpha$  et la  $\beta$ -tubuline. L' $\alpha$  et la  $\beta$ -tubuline sont ensuite délivrées à TBCE et TBCD lesquels formeront un « supercomplexe » transitoire avec TBCC (TBCE/ $\alpha$ -tubuline/TBCC/ $\beta$ -tubuline/TBCD) grâce auquel un hétérodimère  $\alpha\beta$ -tubuline est assemblé ou dégradé (Figure 2B) (Tian et al., 1997).

### c) *Arl2*

Des études génétiques dans différents modèles ont identifié la GTPase Arl2 (ADP ribosylation factor-like protein 2) comme une protéine régulant les cofacteurs de la tubuline et la dégradation de l' $\alpha\beta$ -tubuline (Antoshechkin and Han, 2002; Price et al., 2010). Lorsque Arl2 est inactivée chez *Saccharomyces cerevisiae* (*cin4*), les microtubules ne peuvent plus polymériser. Ce phénotype a précédemment été observé avec l'inactivation de TBCC, TBCD et TBCE (Fleming et al., 2000; Nithianantham et al., 2015; Chen et al., 2016). De nouvelles études montrent que Arl2 forme un complexe stable avec TBCD, la  $\beta$ -tubuline et TBCE (Nithianantham et al., 2015, Francis et al., 2017). Un nouveau modèle est proposé, appelé le modèle « cyclique » dans lequel trois sous unités, TBCD, TBCE et Arl2 ne se désassemblent pas entre chaque cycle de formation d'un hétérodimère comme précédemment suggéré (Tian et al., 1999). Ce modèle met en évidence une régulation catalytique de la biogenèse et la dégradation des hétérodimères  $\alpha\beta$ -tubulines. La liaison transitoire de TBCC avec le complexe permettrait d'activer l'hydrolyse de Arl2-GTP (Guanosine triphosphate) en Arl2-GDP (Guanosine diphosphate) et de contrôler la quantité d'hétérodimères de tubuline solubles, régulant ainsi la dynamique des microtubules *in vivo* (Nithianantham et al., 2015; Al-Bassam 2017) (Figure 2C). Cependant, le mécanisme exact n'est pas encore élucidé et d'autres

études seront nécessaires pour comprendre avec exactitude la biogenèse et la dégradation des hétérodimères de tubulines.

#### d) TBCE

TBCE est indispensable pour le repliement de l' $\alpha$ -tubuline, ainsi que la formation et la libération du dimère d' $\alpha\beta$ -tubuline. *In vitro*, la surexpression de TBCE empêche la libération des hétérodimères de tubuline dans les cellules humaines menant à une destruction du réseau de microtubule en interphase (Kortazar et al. 2006; Kortazar et al. 2007). En revanche, chez *Drosophila melanogaster*, la surexpression de TBCE n'a aucun effet, ce qui laisse suggérer une fonction différente selon les organismes (Jin et al., 2009). La déplétion de TBCE, quant à elle, n'induit aucun changement des niveaux totaux de tubulines endogènes chez tous les organismes étudiés (Schaefer et al., 2007; Jin et al., 2009; Parvari et al., 2002). Cependant, les cellules déplétées pour TBCE contiennent plus de tubulines solubles et moins de tubulines polymérisées que les cellules sans traitement. Ce qui laisse penser qu'en absence de TBCE, bien que les niveaux de tubulines restent inchangés, les microtubules ne sont pas capables de polymériser normalement (Schaefer et al., 2007; Jin et al., 2009 ; Bellouze et al., 2014).

TBCE est composé de trois domaines, un domaine CAP-Gly (Cytoskeleton-Associated Protein Glycine Rich) en N-ter, un domaine LRR (Leucine Rich Repeat) et un domaine UBL (Ubiquitin Binding Like domain) en C-ter. Ces deux derniers permettraient les interactions protéines-protéines notamment le domaine UBL avec le protéasome (Serna et al., 2015). Le domaine CAP-Gly, quant à lui, est connu pour interagir avec des protéines contenant la séquence EEY (tel que la queue C-ter de l' $\alpha$ -tubuline) au travers d'un motif consensus GK(N/H)DG conservé (Steinmetz and Akhmanova, 2008). Contrairement à la levure, la mutation du gène *tbce* est muté (au niveau du CAP-Gly) chez *Drosophila melanogaster*, entraîne une létalité au stade embryonnaire, démontrant ainsi que *tbce* est un gène essentiel chez certains organismes (Jin et al., 2009). Il existe une protéine appelée COEL (Tubulin Folding Cofactor E-Like) pour sa similarité de séquence protéique avec TBCE qui est une protéine déstabilisatrice de la tubuline identifiée chez l'homme. COEL ne possède pas de domaine CAP-Gly en N-ter (Bartolini et al., 2005; Lundin et al., 2010) et sa surexpression provoque la dépolymérisation des

microtubules dans les cellules humaines (Bartolini et al., 2005). Bien que TBCE semble avoir un rôle fondamental dans la formation et le maintien du réseau de microtubules en interphase, il n'y a aucune étude du rôle de cette protéine lors de l'assemblage du fuseau mitotique.

#### *e) La dérégulation du repliement conformationnel de l'hétérodimère de tubuline est impliquée dans des pathologies humaines*

La dérégulation du repliement conformationnel de l'hétérodimère de tubuline est associée à de nombreuses pathologies. La GAN (Neuropathie à axones géants) est une maladie neurodégénérative autosomale récessive résultant d'une mauvaise dégradation de TBCB qui est en excès et provoque une dépolymérisation des microtubules (Wang et al., 2005; Cleveland et al., 2009; Helferich et al., 2018). Chez les souris, une mutation faux-sens dans le domaine CAP-Gly du gène *tbce* cause une neuropathie motrice progressive (*pmn*) qui se traduit par une diminution du nombre de microtubules. Les souris atteintes de *pmn* manifestent des dégénération neuronales, des faiblesses musculaires et des insuffisances respiratoires (Martin et al., 2002; Bommel et al., 2002, Rak et al., 2013; Schäfer et al., 2017). Chez l'humain, une délétion dans le domaine CAP-Gly de TBCE est responsable de syndromes entraînant des problèmes de développements létaux, rares, récessifs et congénitaux appelés HRD (Hypoparathyroidism Retardation mental and Dysmorphism) et le syndrome de Kenny-Caffey/Sanjad-Sakati (Parvari et al., 2002; Hershkovitz et al., 2007; Sferra et al., 2016). Ces syndromes sont dus à une délétion de quatre acides aminés adjacents au motif conservé GK(N/H)DG, ce qui entraîne une destruction du réseau de microtubules. Il a été proposé que cette délétion perturberait l'interaction avec l' $\alpha$ -tubuline (Steinmetz and Akhmanova, 2008). Une autre mutation du gène *tbce*, entraînant la production d'une protéine tronquée, en amont du motif conservé GK(N/H)DG, est associé à un syndrome. Bien que associé à la maladie humaine, cette protéine est partiellement fonctionnelle (Tian et al., 2006). Plus récemment, des études ont montré que des mutations du gène *tbcd* provoquent des cas d'encéphalites neurodégénératives précoces mettant un peu plus en évidence l'importance des cofacteurs de la tubuline dans le développement (Miyake et al., 2016; Edvardson et al., 2016; Gronbord et al., 2018).

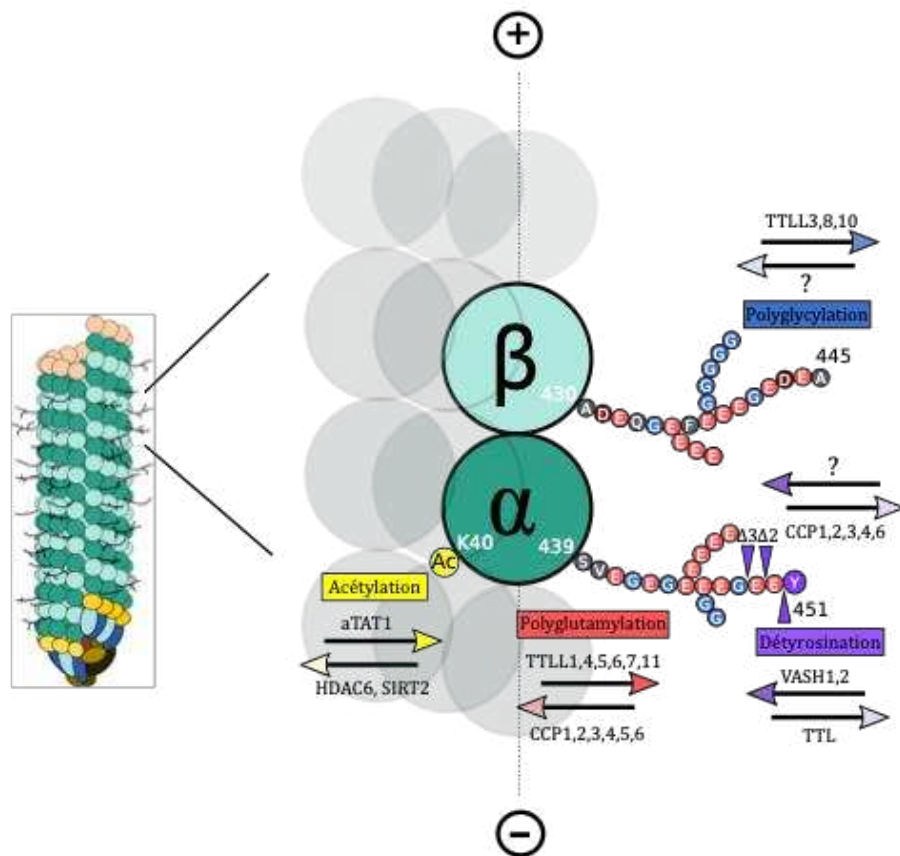
### I.A.3 L'hétérogénéité de la tubuline : isotypes et modifications post-traductionnelles

La séquence primaire, la structure et le repliement des protéines de la tubuline sont très conservés au cours de l'évolution chez les eucaryotes. Cependant la tubuline est sujette à des hétérogénéités de deux types : l'expression de différents isotypes et des modifications post-traductionnelles. Ces hétérogénéités permettent de former des populations distinctes de microtubules en fonction du type cellulaire. De plus, nous allons voir que certaines MAPs et moteurs moléculaires sont sensibles aux modifications post-traductionnelles (appelé « le code de la tubuline ») qui module leur affinité pour les microtubules.

#### *a) Les isotypes de la tubuline*

Les clonages des premiers gènes de la tubuline ont eu lieu dans la fin des années 70 (Cleveland et al., 1978), mettant en évidence que plusieurs gènes codaient pour l' $\alpha$  ou la  $\beta$ -tubuline. Ceci permet la traduction de tubulines avec des séquences en acides aminés qui varient légèrement (Luduena et al., 1992). Chez les mammifères, il existe 8 gènes codant pour l' $\alpha$ -tubuline et 9 pour la  $\beta$ -tubuline (2 gènes codant pour l' $\alpha$ -tubuline et 2 gènes codant pour la  $\beta$ -tubuline chez la drosophile).

Certains isotypes sont exprimés de façon ubiquitaires alors que d'autres sont limités à certaines cellules spécifiques (Leandro-Garcia et al., 2010; Katsetos et al., 1987). Différents isotypes peuvent s'échanger pour l'assemblage du microtubule (Lewis and Cowan, 1987). Cependant, certaines études ont montré que la substitution d'un isotype peut entraîner des défauts au sein de certains tissus, ce qui indique qu'ils sont non interchangeables dans certaines conditions (Hoyle and Raff, 1990; Saillour et al., 2014). De nouvelles études montrent que les isotypes de tubulines influent sur les propriétés structurales et dynamiques des microtubules. En effet, la stabilité et le nombre de protofilaments au sein du microtubule varie en fonction de la composition du microtubule en isotypes de  $\beta$ -tubulines, (Paluma et al., 2016; Ti et al., 2018).



**Figure 3 : Les modifications post-traductionnelles**

Schéma illustrant les différentes modifications post-traductionnelles des dimères de tubulines avec leurs positions respectives. Les différentes enzymes responsables de ces modifications post traductionnelles sont aussi précisées. (inspiré de Janke, 2014)

## ***b) Les modifications post-traditionnelles de la tubuline***

### ***b1) Les principales modifications post-traductionnelles***

La tubuline est sujette à de nombreuses modifications post-traductionnelles. La plupart se situent à la fois sur l' $\alpha$  et la  $\beta$ -tubuline mais certaines concernent uniquement l' $\alpha$ -tubuline. Les plus connues sont l'acétylation de la lysine 40 ou la détyrosination en C-ter de l' $\alpha$ -tubuline. Il existe aussi la poly-glycylation et la poly-glutamylaton des queues de l' $\alpha$  et la  $\beta$ -tubuline (Figure 3) (Westermann and Weber 2003; Janke 2014).

Toutes ces modifications sont conservées au cours de l'évolution (de la levure à l'homme) et leurs distributions sont spécifiques des phases du cycle. Par exemple les microtubules en interphase sont en majorité tyrosinés (Webster et al., 1987). En revanche les fibres K et le midbody ont des microtubules détyrosinés et poly-glutaminés (Bobinnec et al., 1998, Lacroix et al., 2010).

La plupart de ces modifications sont réversibles et sont catalysées par des enzymes (pour revue Janke, 2014). Par exemple, la détyrosination en C-ter est catalysée par une famille d'enzymes, les vasohibines (VASH1 et 2) (Aillaud et al., 2017). La réaction inverse, c'est à dire l'addition d'une nouvelle tyrosine est catalysée par la Tubuline Tyrosine Ligase Like (TTLL) (Prota et al. 2013). Suite à une détyrosination, les Carboxypeptidases Cytosoliques (CCPs) peuvent enlever des résidus glutamates pour générer des tubulines  $\Delta 2$  ou  $\Delta 3$  (Rogowski et al., 2010, Berezniuk et al., 2012). L'acétylation de la lysine 40 est catalysée par l'aTAT1 et le groupe acétyl est enlevée par une histone désacétylase : HDAC6 ou SIRT2 (Hubbert et al., 2002; North et al., 2003). Les poly-glutamylations et les poly-glycylation sont quant à elles catalysées par les enzymes de la famille TTLL (Regnard et al., 2003; Janke et al., 2005) La Déglutamylation est effectuée par les CCPs (Kimura et al., 2010; Rogowski et al., 2010). Cependant, aucune déglycylase n'a été identifiée jusqu'à aujourd'hui (Figure 3).

## b2) Le rôle des modifications post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles ont des rôles directs sur les propriétés biophysiques des microtubules. L'exemple le mieux connu est celui de l'acétylation de la lysine 40 de l' $\alpha$ -tubuline, une modification post-traductionnelle retrouvée dans la lumière du microtubule. Cette modification est essentielle afin de stabiliser les microtubules et les protéger contre le stress mécanique (Portran et al., 2017).

D'autres modifications post-traductionnelles vont « décorer » la paroi du microtubule, ce qui permet d'interagir spécifiquement avec certaines MAPs. Des travaux ont montré que les modifications post-traductionnelles sont directement impliquées dans le recrutement sur le microtubule des moteurs protéiques tel que la kinésine-1, 2, et 13 ainsi que la dynéine. Ce sont des protéines impliquées dans des processus cellulaires tel que le transport cellulaire, l'interaction avec les chromosomes ou l'organisation du fuseau mitotique (Hammond et al., 2010; Peris et al., 2006; Peris et al., 2009). Ces moteurs sont sensibles à la présence de tyrosine en C-ter de l' $\alpha$ -tubuline (Sirajuddin et al., 2014 ; McKenney et al., 2016). La kinésine-7, quant à elle, interagit avec les chromosomes, ce qui permet leur congression. Cette kinésine est préférentiellement retrouvée sur les microtubules détyrosinés (Barisic et al., 2015).

### I.A.4 La cinétique d'assemblage de la tubuline

#### a) La nucléation spontanée

Bien que la nucléation soit régulée par de nombreux facteurs dans les cellules, *in vitro*, les microtubules sont capables de nucléer spontanément à partir de dimères de tubulines purifiées dans une solution tampon contenant du GTP, des ions  $Mg^{2+}$  à une température de 35°C ainsi qu'un pH physiologique (Voter et al., 1984). La nucléation spontanée débute par une étape d'oligomérisation de la tubuline. Cette étape demande de passer une barrière énergétique élevée, défavorable, dépendante de la concentration de tubuline-GTP appelée la concentration critique (qui est d'environ 20 $\mu$ M pour la tubuline de mammifères). Deux modèles sont proposés afin d'expliquer ce phénomène de nucléation spontanée. 1) Les dimères de tubulines s'associent de façon tête à queue pour former des protofilaments qui s'associeront ensuite en feuillet. Lorsque des

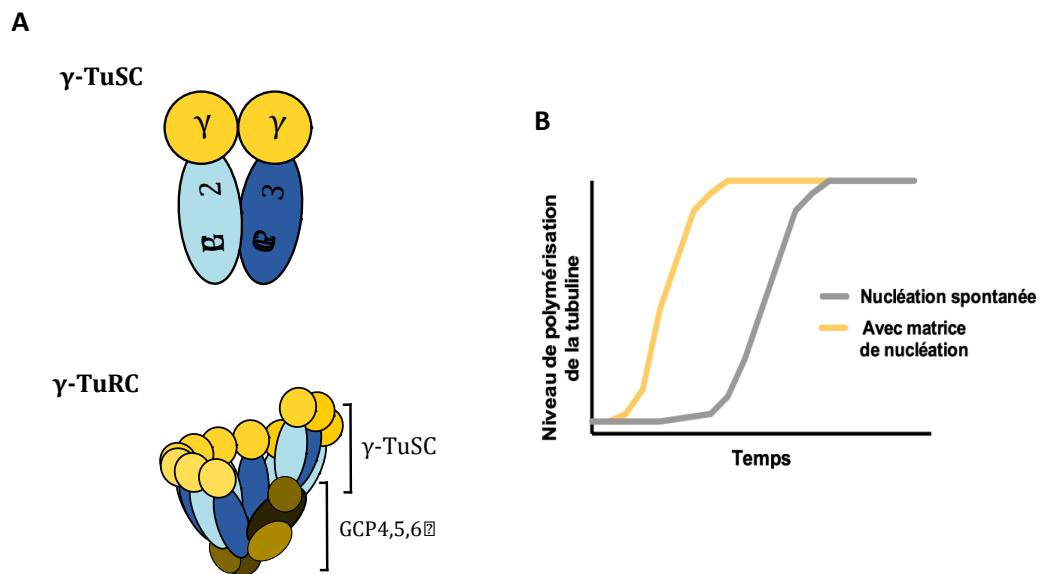
dimères s'ajoutent latéralement il va y avoir une fermeture du feuillet qui forme le microtubule. 2) Les dimères s'associent latéralement pour former un oligomère de tubuline. C'est cet assemblage latéral d'une dizaine d'hétérodimères qui permettent de former la matrice de départ à partir de laquelle se constituera le microtubule (revue Job et al., 2003). Il est intéressant de préciser que la concentration nécessaire à l'élongation des microtubules préexistants est d'environ  $1\mu\text{M}$  soit nettement inférieure à la concentration critique (Wieczorek et al. 2015).

### ***b) La nucléation avec matrice***

*In vivo*, de nombreuses études ont montré que la nucléation requiert un autre membre de la famille des tubulines : la  $\gamma$ -tubuline. La purification de la  $\gamma$ -tubuline à partir d'œuf de xénope et d'embryons de *D. melanogaster* a permis d'identifier un complexe de taille de 2,2MDa (Moritz et al., 2000). Ce complexe appelé  $\gamma$ -TuRC ( $\gamma$ -tubulin Ring complex) contient la  $\gamma$ -tubuline, GCP2 ( $\gamma$ -tubulin complexe protein 2 ou Grip84 chez la drosophile), GCP3 (Grip91), GCP4 (Grip75), GCP5 (Grip128), GCP6 (Grip163). Un doublet de  $\gamma$ -tubuline s'associe avec GCP2 et GCP3 pour former le complexe  $\gamma$ -TuSC ( $\gamma$ -tubulin small complex) (Figure 4A en haut). Le  $\gamma$ -TuRC est donc composé de plusieurs  $\gamma$ -TuSC et associé avec les protéines GCP4, GCP5 et GCP6 (Figure 4A en bas). Ainsi 13  $\gamma$ -tubulines s'associent latéralement en forme d'anneau correspondant au nombre de protofilaments au sein du microtubule. Ce complexe est essentiel pour initier la nucléation des microtubules à des concentrations en tubuline soluble bien inférieures à la concentration critique (environ  $6\mu\text{M}$  *in vitro*), permettant de réduire voire de s'affranchir de la phase de latence observée avec la nucléation spontanée (Figure 4B) (Kollman et al., 2011; Wieczorek et al. 2015).

### ***c) La nucléation sans $\gamma$ -TuRC***

Différentes expériences ont montré que l'inactivation du  $\gamma$ -TuRC dans des embryons de drosophile ou *C.elegans* perturbe l'assemblage du fuseau mitotique mais que les microtubules sont toujours capables de nucléer (Sampaio et al., 2001; Hannak et al., 2002). Ces observations ont été confirmées par de l'imagerie en temps réel, ce qui



**Figure 4 : Le complexe  $\gamma$ -tubuline**

A) Le complexe ( $\gamma$ -TuSC) est très conservé et essentiel à l'initiation de la nucléation des microtubules. Le  $\gamma$ -TuSC contient deux copies de  $\gamma$ -tubuline associées à GCP2 et GCP3. Plusieurs  $\gamma$ -TuSC s'assemblent avec GCP4, GCP5, GCP6 (formant un complexe en forme d'anneau, le  $\gamma$ -TuRC, qui permet l'initiation de nucléation du microtubule).

B) Graphique représentant l'impact de la matrice de nucléation sur la polymérisation de la tubuline au cours du temps. Le  $\gamma$ -TuRC réduit le temps de latence observé lors de la nucléation spontanée des microtubules.

laisse suggérer que d'autres protéines (en parallèle et/ou en collaboration avec la  $\gamma$ -TuRC) sont capables d'initier la polymérisation des microtubules, certaines MAPs (Microtubules Associated Proteins ou Protéines associées aux microtubules) (Section II.B) (Rogers al., 2008).

### I.A.5 Les propriétés dynamiques des microtubules

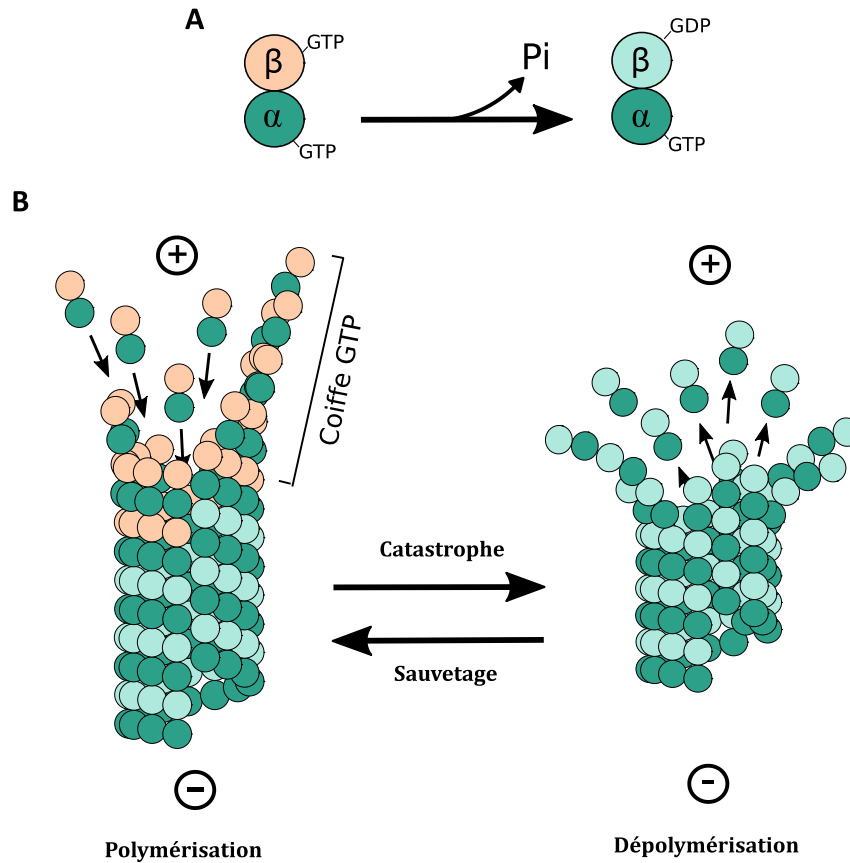
#### a) *L'instabilité dynamique des microtubules*

Le microtubule est une structure très dynamique qui oscille rapidement entre phases d'élongation (polymérisation) et de raccourcissement (dépolymérisation). Mitchison et Kirschner sont les premiers à décrire ce phénomène qu'ils ont appelé « instabilité dynamique » (Mitchison and Kirschner, 1984). Elle est définie en fonction de quatre paramètres : (1) la vitesse de polymérisation, (2) la vitesse de dépolymérisation, (3) la fréquence de « catastrophes » (quand le microtubule passe d'une phase de polymérisation à une phase de dépolymérisation) et (4) la fréquence de « sauvetages » (quand le microtubule passe d'une phase de dépolymérisation à une phase de polymérisation) (Mitchison and Kirschner 1984) (Figure 5B).

Tous ces différents paramètres sont dépendants de la concentration locale en tubuline libre. Walker et al., (1988) ont montré que la vitesse d'élongation aux deux extrémités augmente avec la concentration de tubuline. En augmentant la quantité de tubuline disponible, il y a une diminution des catastrophes qui s'accompagne d'une augmentation des sauvetages. L'instabilité dynamique peut aussi être directement régulée par les MAPs (Section II.B).

#### b) *La coiffe-GTP*

La polarité intrinsèque des microtubules influe sur la dynamique de chacune des extrémités (Allen and Borisy, 1974). L'extrémité (-) des microtubules est décrite comme plus stable et moins dynamique que l'extrémité (+). Ce phénomène est expliqué par l'activité GTPase de la tubuline. Comme décrit précédemment, les deux sous unités de tubulines possèdent un site de liaison à une molécule de GTP. Le GTP lié à l' $\alpha$ -tubuline n'est ni échangeable ni hydrolysable alors que le GTP présent sur la sous unité de la



**Figure 5 : La dynamique des microtubules**

A) L'activité GTPase de la tubuline. La molécule de GTP de la  $\beta$ -tubuline est capable d'être hydrolysée en GDP et  $P_i$  (Phosphate inorganique).

B) Les microtubules se dépolymérisent et se repolymérisent continuellement ce phénomène est appelé « l'instabilité dynamique ». Quand un dimère de tubuline s'ajoute à l'extrémité d'un microtubule, la molécule de GTP de la  $\beta$ -tubuline est hydrolysée en GDP et  $P_i$  après un certain temps. L'hydrolyse du GTP change la conformation des sous-unités et affaiblit les liaisons dans le polymère. Les protofilaments peuvent alors se séparer et les dimères de tubuline situés à l'extrémité (+) des microtubules peuvent se libérer.

$\beta$ -tubuline est hydrolysable au niveau du site E. L'hétérodimère qui s'incorpore possède une  $\beta$ -tubuline liée au GTP. Lors de l'interaction avec un autre hétérodimère, le GTP est hydrolysé en GDP. (Weisenberg and Deery, 1976; Nogales et al., 1990, Nogales et al., 2000). Le décalage temporel entre le moment où un hétérodimère s'incorpore dans le microtubule et l'hydrolyse de son GTP entraîne l'existence d'une population de tubuline-GTP à l'extrémité (+) : c'est la coiffe GTP. L'hydrolyse du GTP en GDP entraîne un changement de conformation du dimère et notamment une compaction du site E de l' $\alpha$ -tubuline, générant une contrainte globale qui tend à déstabiliser le microtubule. Par contre si la vitesse d'hydrolyse du GTP devient plus rapide que la vitesse d'incorporation de nouveaux dimères, la coiffe disparaît et une catastrophe se produit. En l'absence de coiffe, les liaisons latérales entre les protofilaments cèdent, entraînant une dépolymérisation rapide (Alushin et al., 2014; Zhang et al., 2015). Par conséquent, la présence de cette coiffe stabilise l'élongation du microtubule en empêchant les événements de catastrophes (Desai et Mitchison, 1997). Il a été montré que la  $\beta$ -tubuline liée au GDP peut être incorporée à l'extrémité (+) du microtubule mais ceci altère sa dynamique *in vitro* (Valiron et al., 2010).

## I.B Le centrosome

Une structure majeure responsable de la nucléation des microtubules est le centrosome. Bien que non nécessaire à l'établissement d'un fuseau bipolaire, les centrosomes sont les sites majeurs de la nucléation des microtubules ou MTOCs (Microtubule-organizing centers ou centre organisateur de microtubule) dans la plupart des cellules somatiques animales. Ces structures sont importantes pour l'assemblage et l'orientation du fuseau mitotique. Plus de 200 protéines ont été identifiées par spectrométrie de masse au niveau de cet organite, comme la  $\gamma$ -TuRC ou des protéines associées aux microtubules (Müller et al., 2010).

### I.B.1 Structure

Le centrosome est constitué de deux centrioles de 100 à 500nm de long, arrangés de façon orthogonale l'un par rapport à l'autre. Chez la plupart des vertébrés, les centrioles sont formés de neuf triplets de microtubules très stables en forme de cylindre. Les nouveaux centrioles (appelés centrioles fils) s'assemblent autour d'une structure : le

« cartwheel », composé d'un noyau central et de neuf rayons. Cette structure est absente dans la plupart des centrioles plus âgés (centrioles père) (Figure 6, à gauche). La structure du centrosome varie énormément au cours de l'évolution. Par exemple, chez la drosophile les centrioles sont généralement plus courts et sont composés de doublets de microtubules au lieu de triplets. De plus, le « cartwheel » est présent chez le centriole père et fils. Les centrosomes s'organisent dans le matériel péri-centriolaire (PCM), un nuage de matériel amorphe non membranaire. Dans le PCM, la cellule concentre des complexes de  $\gamma$ -tubulines qui permettent la nucléation de microtubules (Fu and Glover, 2012; Sonnen et al., 2012; Conduit et al., 2015).

### **I.B.2 Le Cycle du centrosome**

Comme l'ADN, les centrosomes se dupliquent une seule fois par cycle cellulaire. Chaque centrosome sera hérité par une des cellules filles à la fin de la division cellulaire (Nigg, 2007). Le cycle de duplication et ségrégation des centrosomes peut être subdivisé en plusieurs étapes : le désengagement, la duplication, la maturation et la séparation. Le désengagement (anciennement appelé désorientation) intervient à la sortie de la phase M (ou au début de la phase G1) quand le lien étroit entre les centrioles père et fils est rompu. Cette séparation des deux centrosomes est régulée par des moteurs moléculaires (Section I.B.5.A). Cependant, les centrioles sont toujours connectés par une structure filamenteuse lâche. Pendant la phase S, les centrioles père et fils se dupliquent. Lorsque les centrioles atteignent leur pleine longueur en fin de phase G2, les deux paires de centrioles, qui sont devenues des centrosomes accumulent du PCM, c'est la maturation. Durant la prophase de la division cellulaire, le lien entre les centrosomes est rompu, ils se séparent et jouent leur rôle de centres organisateurs de microtubules (Conduit et al. 2015).

### **I.B.3 Le PCM (Matériel Péri-centriolaire)**

#### **a) Introduction**

Des décennies de génétique, de biologie cellulaire et de biochimie ont permis d'identifier les protéines clés nécessaires à l'assemblage du PCM. Pendant la mitose la taille et la capacité de nucléation des centrosomes augmentent, c'est la maturation.

L'architecture du PCM mitotique apparaît comme un nuage amorphe principalement constitué principalement de CDK5RAP2 et la  $\gamma$ -TuRC. Cette structure permet l'augmentation de la nucléation des microtubules (Figure 6, à droite). C'est un événement important pour de nombreuses cellules afin de participer à la bipolarisation et à l'assemblage spatio-temporel du fuseau mitotique (Conduit et al., 2015).

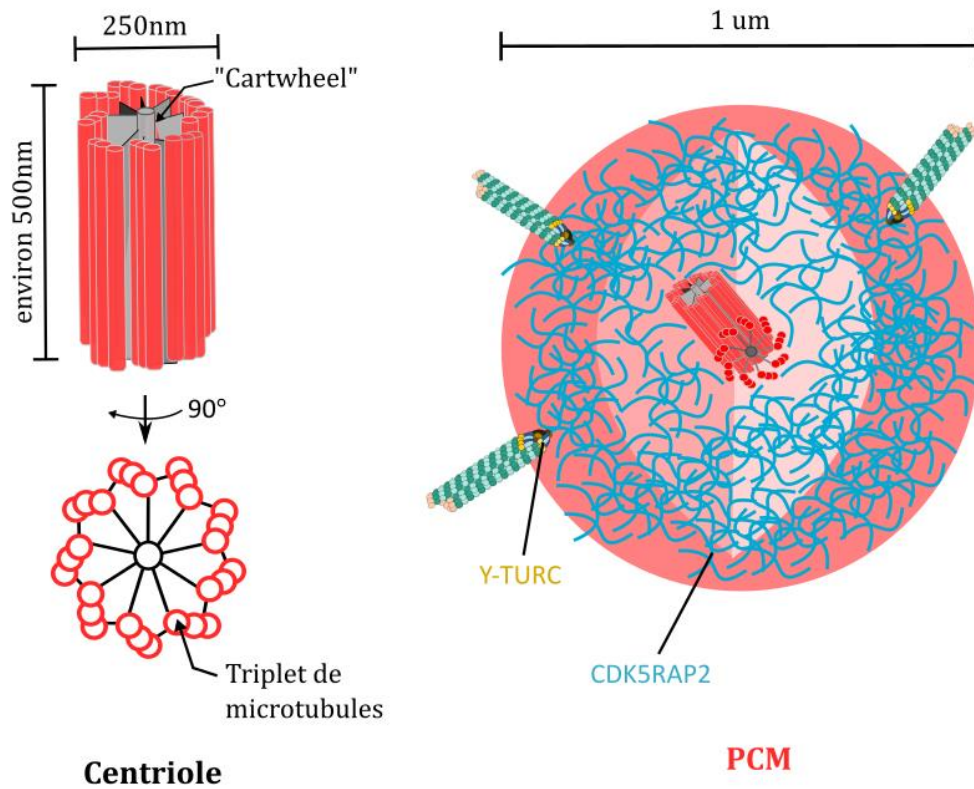
## ***b) L'assemblage du PCM au travers de la transition de phase***

### ***b1) Concept de la transition de phase***

Une avancée dans la compréhension de l'assemblage du PCM des centrosomes est la découverte que les transitions de phases des protéines peuvent jouer un rôle dans son assemblage et la nucléation des microtubules. Ce processus biochimique est décrit par le fait que certaines protéines ont la capacité de s'accumuler au sein d'un compartiment non membranaire. Les protéines ayant ces propriétés structurales particulières d'auto-assemblage produisent des gouttelettes protéiques physiquement séparées du cytoplasme, comme l'huile avec l'eau. Ce comportement est connu sous l'appellation « Séparation de Phase Liquide-Liquide » (LLPS) qui permet à la cellule de séparer certaines régions au sein du cytoplasme. Cependant, dans cet état, l'échange avec le cytoplasme est maintenu. Ceci permet à des protéines dites « clientes » de s'accumuler au sein de cette transition de phase. Cette concentration de protéines clientes constitue un potentiel mécanisme qui permet d'augmenter les vitesses de réaction dans la cellule (Banjade and Rosen, 2014; Jiang et al., 2015; Li et al., 2012). Les transitions de phases sont produites à partir de la multimérisation de protéines qui ont des domaines intrinsèquement non structurés et/ou des séquences dites de faibles complexités. Ce mécanisme permet de former des centres organisateurs dans la cellule qui sont essentiels à la formation de structure tel que le PCM mitotique (Shin and Brangwynne, 2017).

### ***b2) Le PCM mitotique***

Avant l'assemblage du fuseau mitotique, le PCM du centrosome s'assemble via la multimérisation de CDKRAP2 (chez l'homme), la Centrosomine (chez la drosophile) ou SPD-5 (chez *C.elegans*) (Feng et al., 2017; Fong et al., 2008; Woodruff et al., 2015).



**Figure 6 : L'organisation du centrosome**

A) Organisation d'un centriole. Chez les vertébrés, le centriole est constitué de neuf triplets de microtubules (doublet chez la drosophile). Le centriole s'arrange autour d'une structure appelée le « cartwheel ». B) Organisation des différentes protéines recrutées dans le PCM (Matériel Péricentriolaire) interphasique C) Pendant la maturation, le PCM du centrosome s'étend et recrute des protéines tel que la  $\gamma$ -TuRC qui augmente son potentiel de nucléation.

Une fois assemblées, ces protéines forment le PCM mitotique qui est capable de recruter des protéines comme la tubuline, des kinases ou d'autres protéines agissant sur la nucléation des microtubules, comme certaines MAPs (XMAP215, TPX2) (Woodruff et al., 2017). A la fin de la mitose le PCM mitotique est désassemblé (Conduit et al., 2015).

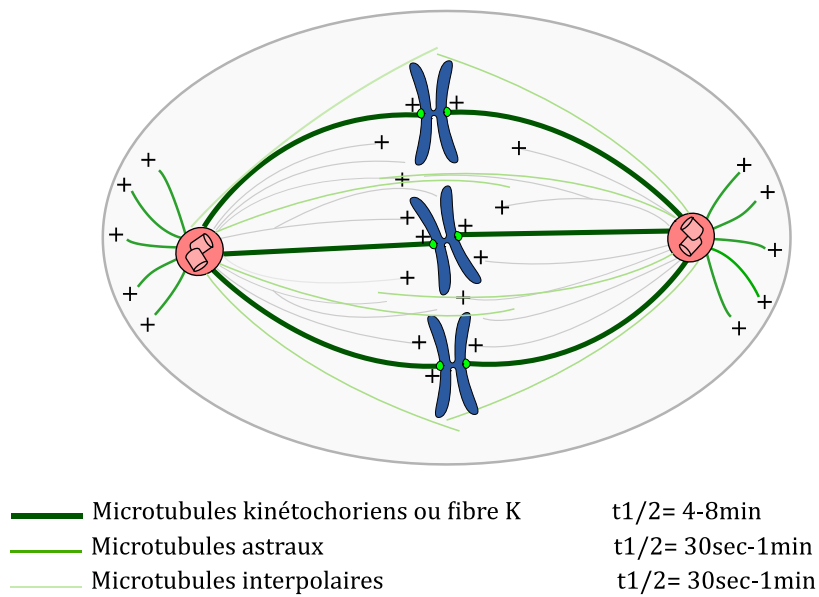
## **II. L'assemblage du fuseau mitotique**

Le fuseau mitotique est une structure bipolaire composée de trois grandes catégories de microtubules : les microtubules kinétochoriens, les microtubules interpolaires et les microtubules astraux (Dumont and Mitchison 2009) (Figure 7).

Les microtubules kinétochoriens ont leurs extrémités (+) qui interagissent avec les kinétochores (un assemblage supramoléculaire de protéines au niveau des régions centromériques Section III.B) et leurs extrémités (-) avec les pôles du fuseau (Mc Donald et al., 1992). L'association de plusieurs microtubules entre eux (« bundles » de 20 à 40 microtubules chez les vertébrés) forment les fibres kinétochoriennes : fibres-k, ce qui leur confère une plus grande stabilité que les autres types de microtubules (Mc Ewen et al., 1997, Bakhoum et al., 2009). Ces microtubules exercent une force de traction sur les kinétochores afin de séparer les chromatides sœurs vers les pôles du fuseau en anaphase (McIntosh et al., 2002).

Les microtubules interpolaires quant à eux, s'étendent d'un pôle à l'autre et vont former l'armature du fuseau mitotique. Environ 95% des microtubules du fuseau peuvent être qualifiés d'interpolaires, ils s'organisent préférentiellement de façons antiparallèles par groupe de 2 à 6 (Mastronade et al., 1993).

Finalement, les microtubules astraux interagissent (de part leurs extrémités (+)) avec le cortex ce qui permet d'ancrer les pôles et donc d'orienter correctement le fuseau dans la cellule (Grill et al., 2003). Dans la plupart des cellules, la majorité des microtubules provient des centrosomes (quand elles en possèdent). Cependant, des mécanismes additionnels ont été découverts et montrent une véritable coopération de différentes voies qui permettent la formation du fuseau mitotique.



### Figure 7 : Les sous classes de microtubules

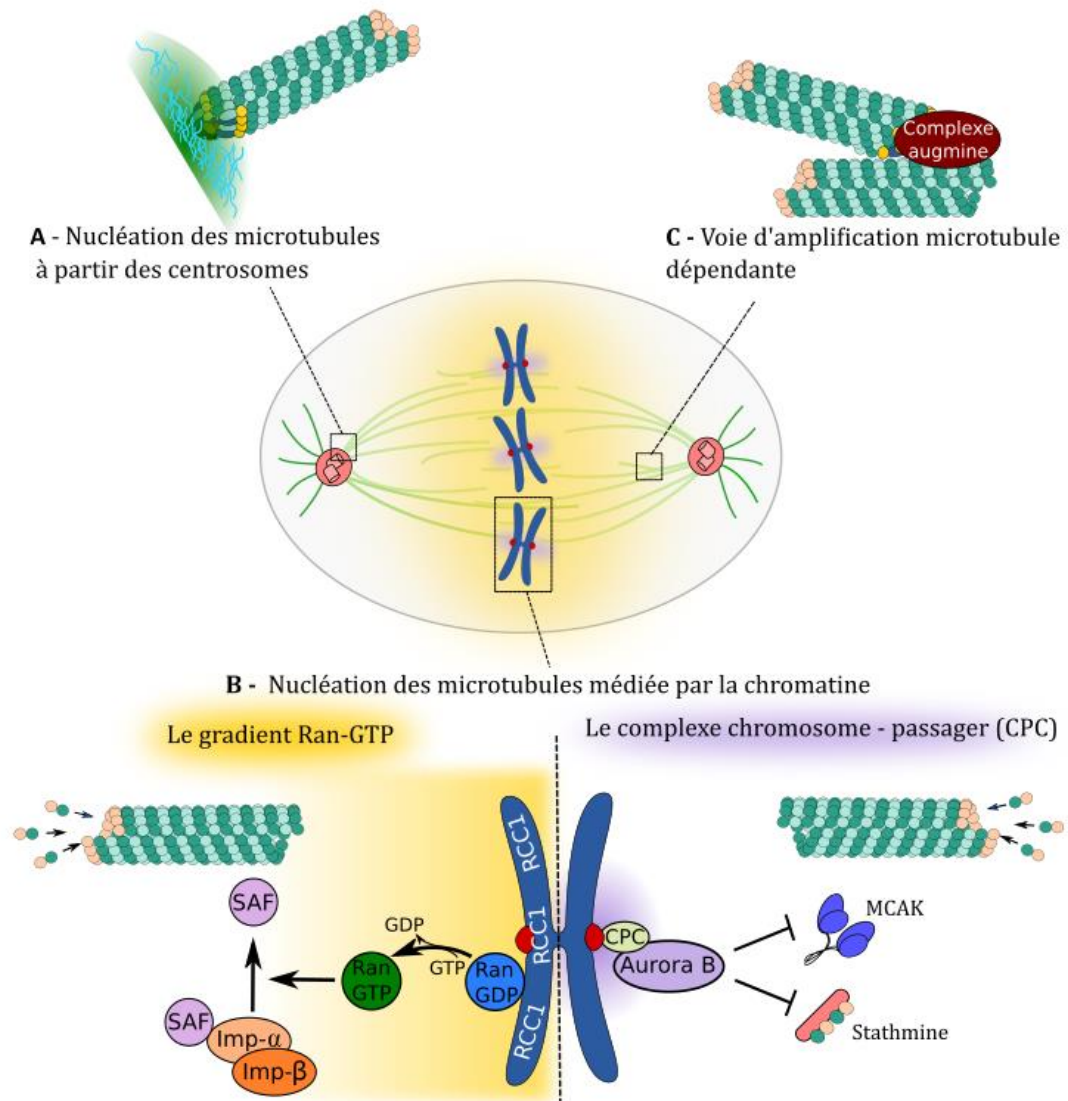
Représentation schématique d'un fuseau en métaphase avec les sous populations de microtubules : avec les microtubules interpolaires (—), les fibres K (—) et les microtubules astraux (—). L'extrémité (+) de croissance est indiquée par le «+». Les temps de  $\frac{1}{2}$  vie des différentes classes sont précisés (Meunier and Vernos. 2016).

De plus comme nous allons le voir, de nombreuses protéines participent à l'élaboration de cette structure en interagissant directement avec les microtubules, les MAPs (Microtubules Associated Proteins).

## II.A Les voies de nucléation non centrosomales

Pendant de nombreuses années les centrosomes étaient vus comme les seuls MTOCs de la cellule. Cependant, même si les centrosomes sont les principaux MTOCs de la cellule, la densité en microtubules nucléés par les centrosomes diminue en fonction de l'éloignement par rapport ceux-ci. Par conséquent, la probabilité qu'un kinétochore soit capturé diminue donc rapidement en fonction de la distance entre le centrosome et le chromosome. Ainsi une modélisation mathématique prédit que plusieurs heures seraient nécessaires à la capture des 92 kinétochores d'une cellule humaine (Wollman et al., 2005). De plus, certaines cellules sont dépourvues de centrosomes tel que les ovocytes de mammifères et les cellules végétales. Finalement, il a été montré chez la drosophile que les centrosomes ne sont pas indispensables au développement et à l'assemblage du fuseau mitotique (Khodjakov et al., 2000; Basto et al., 2006; Bettencourt-Dias, 2013).

Pendant longtemps, les chromosomes étaient considérés comme des éléments passifs au cours de la division cellulaire. En effet, des études ont montré la formation de fuseaux mitotiques bipolaires en absence de chromosome (Heald et al., 1996; Faruki et al., 2002; Bucciarelli et al., 2003). Cependant, la chromatine participe directement à la nucléation des microtubules grâce à la formation de gradients qui stabilisent les microtubules. Ce n'est seulement lorsque les centrosomes sont affectés que l'on peut observer l'importance de la contribution de ces voies additionnelles de nucléation. En effet, il y a une forte augmentation de la polymérisation des microtubules autour des kinétochores lorsque l'on inhibe l'activité des centrosomes, par interférence à l'ARN (ARNi) contre la kinase Plk1, une kinase essentielle pour la maturation des centrosomes (Torosantucci et al., 2008; Lee and Rhee, 2011). Les voies de nucléation médiées par la chromatine permettent l'augmentation de la densité des microtubules autour des kinétochores afin de faciliter leurs captures.



**Figure 8 : Les différentes voies d'assemblages du fuseau mitotique**

A) La voie de nucléation des microtubules à partir des centrosomes. B) La voie de nucléation à partir de la chromatine. À gauche, la voie Ran ou RCC1 lie les chromosomes, ce qui induit une augmentation de la concentration en RanGTP autour de la chromatine. Le gradient RanGTP (en jaune) permet la libération de facteurs d'assemblages du fuseau mitotique de leurs liaisons inhibitrices avec les importines (imp- $\alpha$  et imp- $\beta$ ). Ceci va permettre la nucléation de microtubules autour des chromosomes. À droite, le CPC (Chromosomal Passenger Complex) est quant à lui enrichi au niveau des kinétochores. Le gradient Aurora B (en violet) joue un rôle essentiel car il va inhiber l'activité de la stathmine (une protéine qui séquestre les dimères de tubuline) et de MCAK (une kinésine déstabilisatrice des microtubules). C) La voie de nucléation microtubule dépendante. Les microtubules sont capables de générer de nouveaux microtubules directement à partir de microtubules préexistants via un complexe octamérique, l'augmine, qui est capable de recruter la  $\gamma$ -TuRC.

## II.A.1 Les voies de nucléation des microtubules médiée par la chromatine

### a) Le gradient Ran-GTP

#### a1) Introduction

Les premières démonstrations de l'existence d'un mécanisme de nucléation des microtubules dépendant des chromosomes pendant la division cellulaire ont été obtenues dans les années 1970. Plusieurs groupes ont observé la nucléation de microtubules à proximité ou au niveau des kinétochores (McGill and Brinkley, 1975; Telzer et al., 1975; Bradander et al., 1981). En 1984, des structures semblables à des fuseaux ont été observées après l'injection d'ADN de bactériophage lambda dans des œufs de xénopes (dépourvus de chromatine et de centrosomes) arrêtés en métaphase (Karsenti et al., 1984). En 1996, il a été démontré que des fuseaux bipolaires sont capables de s'assembler autour de billes recouvertes d'ADN plasmidique incubés dans des extraits de xénope (Heald et al., 1996). Ces expériences confortent l'idée selon laquelle la chromatine est capable d'assembler et d'organiser les microtubules.

Dans les années qui ont suivies, la GTPase Ran (Ras-like nuclear protein) a été identifiée comme le facteur déterminant de la nucléation des microtubules dépendant de la chromatine (Kalab et al., 1999; Zhang et al., 1999). Comme toutes les protéines G, son activité est dépendante de sa liaison aux nucléotides guanidiques (active sous forme Ran-GTP). La protéine RCC1 (Regulator of Chromosome Condensation 1 ou Ran-GEF pour Guanine nucleotide Exchange Factor) est associée à la chromatine et stimule l'échange du GTP. Au contraire Ran-GAP (Ran's GTPase-activating factor) est cytoplasmique et catalyse l'hydrolyse du GTP par Ran. Il en résulte une augmentation de Ran-GTP dans le noyau et Ran-GDP dans le cytoplasme, ce qui forme un gradient qui conditionne le sens des échanges nucléocytoplasmiques.

Ran a d'abord été identifiée pour son rôle dans le transport nucléocytoplasmique. En interphase, le transit de protéines (ou cargos) entre le cytoplasme et le noyau s'effectue à travers des pores nucléaires. Les cargos de petites tailles (<40KDa) diffusent

**Tableau 1 :** Les différents facteurs d'assemblage du fuseau mitotique (SAFs) régulé par Ran et leurs rôle(s) et activité(s) respectif(s) (Petry et al., 2016)

| SAFs                     | Rôles et activités                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Références                                                                                                                                                   |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>TPX2</b>              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Organise les pôles du fuseau</li> <li>• Participe à l'assemblage du fuseau mitotique en s'associant avec BRCA1/BARD1, NuMA et XRHAMM</li> <li>• Permet la nucléation de microtubules en s'associant en XRHAMM, NEED1</li> <li>• Nécessaire pour la voie de nucléation des microtubules Augmine</li> <li>• Active la kinase Aurora A</li> </ul> | Gruss et al., 2001<br>Wittmann et al., 2000<br>Tulu et al., 2006<br>Eyers et al., 2004<br>Bayliss et al., 2003<br>Tsai et al., 2003<br>Scrofani et al., 2015 |
| <b>NuMA</b>              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Organise les pôles du fuseau mitotique avec la Dynéine</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                              | Merdes et al., 1996                                                                                                                                          |
| <b>XKID</b>              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Permet l'alignement des chromosomes</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Trieselmann et al., 2003                                                                                                                                     |
| <b>XCTK2</b>             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kinésine qui participe à la formation des pôles et la stabilité du fuseau mitotique</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                 | Ems-McClung et al., 2004                                                                                                                                     |
| <b>Xnf7</b>              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Relie les microtubules entre eux</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Maresca et al., 2005                                                                                                                                         |
| <b>Rae1</b>              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Facteur exportateur de mARN</li> <li>• Impliqué dans la mise en place du SAC</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                        | Blower et al., 2005<br>Jeganathan et al., 2005                                                                                                               |
| <b>HURP</b>              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Relie les microtubules entre eux</li> <li>• Localise au niveau des fibres K</li> <li>• Participe à l'alignement des chromosomes</li> <li>• Forme un complexe avec TPX2, Aurora A, XMAP215 et Eg5</li> </ul>                                                                                                                                    | Koffa et al., 2006<br>Wong et al., 2006                                                                                                                      |
| <b>TAAC3/<br/>Maskin</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Favorise la polymérisation des microtubules</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Albee et al., 2006<br>Gergely et al., 2000                                                                                                                   |
| <b>Lamine B</b>          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Participe à la formation de la « spindle matrix »</li> <li>• S'associe avec Eg5 et XMAP215</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                          | Tsai et al., 2006                                                                                                                                            |
| <b>NuSAP</b>             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Relie les microtubules entre eux</li> <li>• Contribue à l'interaction entre les microtubules et la chromatine</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                       | Ribbeck et al., 2007                                                                                                                                         |
| <b>ISWI</b>              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rôle dans la nucléation des microtubules</li> <li>• Relie les microtubules entre eux</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                | Yokoyama et al., 2009                                                                                                                                        |
| <b>Nup103-160</b>        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Participe à la formation des fibres K</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Mishra et al., 2010                                                                                                                                          |
| <b>MCRS1</b>             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Participe à la formation des fibres K</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Meunier et al., 2011                                                                                                                                         |

librement dans le noyau. En revanche les cargos de taille supérieure nécessitent un transport actif dépendant de Ran (Sorokin et al., 2007). Les cargos transitent à travers les pores nucléaires grâce à des séquences NLS (Nuclear Localisation Signal). Ces séquences NLS permettent l'interaction avec des protéines de transport, les importines  $\alpha$  et  $\beta$ . Une fois que le complexe importines-cargo a pénétré dans le noyau, il va être dissocié sous l'action de la GTPase Ran (lié au GTP), ce qui mène au relargage du cargo dans l'espace nucléaire. Puis le complexe Ran-GTP-importines est exporté dans le cytoplasme où Ran-GAP stimule l'hydrolyse du GTP par Ran. Ainsi les protéines possédant des séquences NLS sont libérées et accumulées dans le noyau.

### a2) Ran-GTP dans l'assemblage du fuseau mitotique

Bien que le transport nucléo-cytoplasmique ne soit pas nécessaire en mitose car l'enveloppe nucléaire est rompue, ce mécanisme moléculaire est essentiel pour favoriser l'assemblage du fuseau mitotique autour de la chromatine (Clarke et Zhang, 2008). L'augmentation de RCC1 sur la chromatine via la phosphorylation de Cdk1 permet l'enrichissement de Ran-GTP au niveau des chromosomes alors que Ran-GAP réside dans le cytoplasme. Cela conduit à un gradient de Ran-GTP à proximité de la chromatine. Ce gradient a été visualisé dans les cellules humaines, les extraits d'œufs de xénope et de souris (Kalab et al., 2002, 2006 ; Dumont et al., 2007). Comme en interphase, ce système permet de contrôler spatialement la stabilité des complexes importines-cargo. Les importines agissent comme des inhibiteurs, en séquestrant les cargos. Ran-GTP permet le relargage et donc l'activation de ces cargos autour de la chromatine qui participeront à l'assemblage du fuseau mitotique. Ces cargos ont été appelés SAFs (Spindle Assembly Factors) (Figure 8B). Le rôle de Ran-GTP dans le cytoplasme pendant la mitose a été observé dans des extraits d'œufs de xénope. L'ajout de Ran-GTP constitutivement actif dans ces extraits est suffisant pour déclencher la nucléation de microtubules, favoriser leurs stabilisations et induire l'organisation du fuseau mitotique (Carazo-Salas et al., 1999, 2001). Par conséquent, un ou plusieurs SAFs sont impliquées dans ces différents événements. Approximativement 12 SAFs ont été identifiés à ce jour pour être directement régulés par le gradient Ran-GTP (Récapitulatif des SAFs, Tableau 1 Petry et al., 2016).

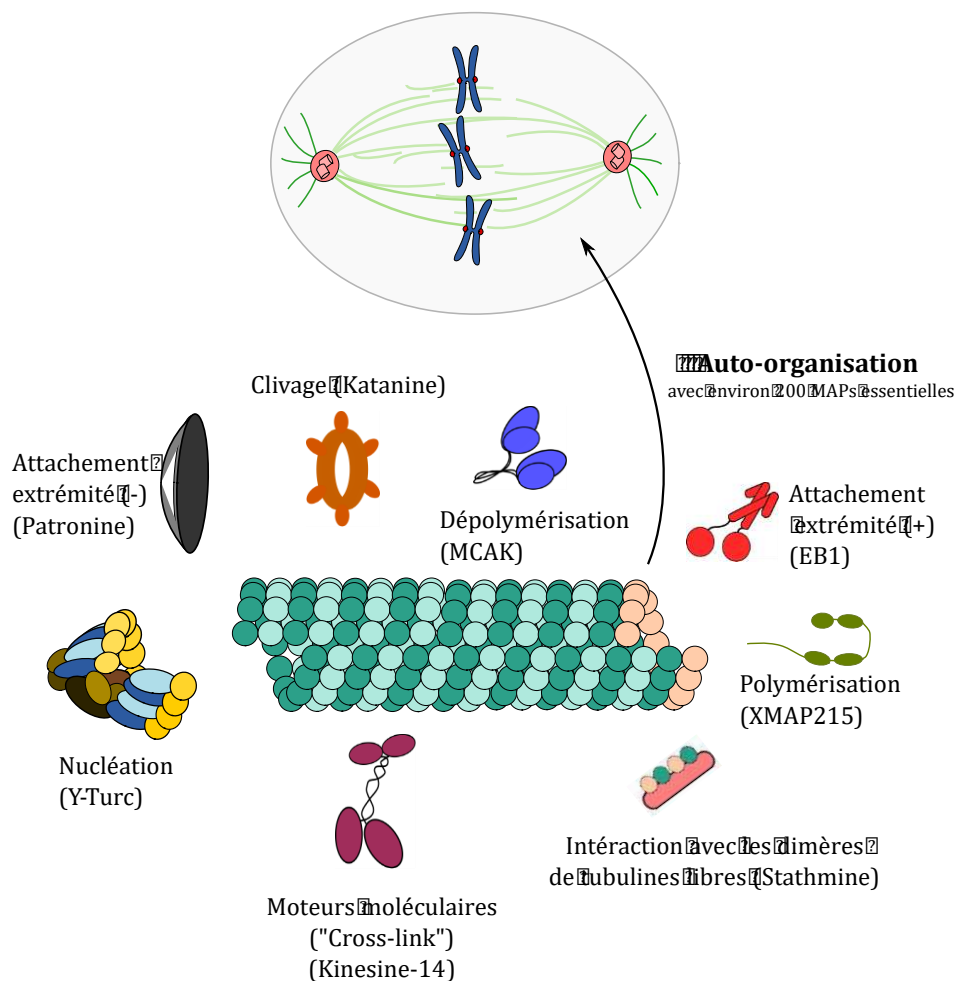
Un SAF essentiel dans l'assemblage du fuseau mitotique régulé par le gradient Ran-GTP est TPX2 (Targeting protein for xenopus kinesin-like protéin 2) (Gruss et al., 2001, 2002, Forbes et al., 2015). Lorsque TPX2 est absent, le fuseau mitotique n'est plus capable de s'assembler chez le xénope. TPX2 permet la nucléation des microtubules en favorisant la polymérisation des microtubules à partir de la tubuline libre en solution autour de la chromatine (Gruss et al., 2001; Kufer et al., 2012; Schatz et al., 2003). Les différents SAFs identifiés ont des fonctions diverses dans l'assemblage du fuseau mitotique comme l'organisation des microtubules (NuMA, XCTK2), l'alignement des chromosomes (XKID, HURP) ou encore la formation de la matrice du fuseau (Lamine B, Rae1). Je reviendrai sur quelques une des cibles de Ran et leurs rôles dans l'assemblage du fuseau mitotique dans la suite du manuscrit.

### *c) Le complexe chromosome-passager (CPC)*

En absence du gradient Ran-GTP, les chromosomes peuvent nucléer des microtubules grâce à un autre groupe de protéines appelé, le complexe chromosome-passager (CPC) (Maresca et al., 2009). Le CPC est formé d'une kinase mitotique Aurora B, INCENP (INner CENTrosome Protein), la Borealine et la Survivine (Carmena et al., 2012). La localisation du CPC change au cours de la mitose d'où son nom « passager ». En métaphase, il est présent sous forme d'un gradient dont l'origine est le centromère. Cette localisation est due à des marques épigénétiques présentes sur les histones H3 (H3T3) et H2A (H2AT120). Ces marques sont retrouvées au niveau du centromère et reconnues par le CPC. Lorsque le CPC est localisé, Aurora B va inhiber par phosphorylation des protéines qui régulent négativement la polymérisation des microtubules. Ces protéines déstabilisatrices sont la kinésine-13 (MCAK : Mitotic centromere-associated kinesin) et la Stathmine (OP18) décrites plus bas (Gheniou et al., 2013; Kelly et al., 2007 Gadea et Ruderman, 2006). Bien que le CPC soit concentré au niveau de chaque centromère, le gradient d'Aurora B s'étend sur toute la longueur du fuseau (Wang et al., 2011). L'activation du CPC participe ainsi à la formation de structures stables, les fibres-k, lesquelles sont incorporées au fuseau mitotique grâce aux dynéines (Maiato et al., 2004).

## II.A.2 La voie d'amplification Microtubules-dépendante

Plus récemment, un mécanisme additionnel qui participe à la formation du fuseau mitotique pendant la mitose a été identifié: la nucléation de microtubules à partir des microtubules eux même. Deux arguments ont été mis en avant pour montrer que le fuseau est une source de nouveaux microtubules. D'abord, la protéine  $\gamma$ -TuRC est retrouvée sur tout le fuseau mitotique (Lüders et al., 2006) et deuxièmement, de nouveaux microtubules sont capables d'émaner directement du fuseau mitotique (Mahoney et al., 2006). Un crible par ARNi sur tout le génome de drosophile en cellules S2 a permis d'identifier cinq gènes « dim  $\gamma$ -tubuline » (dgt2-dgt6). Ces gènes codent pour des protéines essentielles à la localisation de la  $\gamma$ -TuRC au niveau du fuseau mitotique mais pas au niveau des centrosomes. La déplétion de ces protéines induit une réduction de la densité des microtubules du fuseau mitotique (Goshima et al., 2007). Les autres membres du complexe ont été identifiés plus récemment : dgt7 (msd5), dgt8 (wac) et dgt9 (msd1) (Lawo et al., 2009, Uehara et al., 2009). Ces protéines interagissent ensemble afin de former un complexe octamérique appelé Augmine (ou HAUS chez les mammifères pour Homologous to augmin subunits). Ce complexe recrute la  $\gamma$ -TuRC au niveau d'un microtubule existant et initie la nucléation de nouveaux microtubules. Ces nouveaux microtubules sont nucléés dans la même direction et avec un angle faible ( $<30^\circ$ ), ce qui permet d'augmenter la densité du fuseau mitotique (Petry et al., 2013). De façon intéressante, dans cette même étude, les auteurs ont montré que la nucléation de ces microtubules est stimulée par des facteurs impliqués dans la nucléation par la chromatine, Ran-GTP et son effecteur TPX2. Bien que l'augmine ne soit pas strictement indispensable à l'assemblage des fuseaux mitotiques chez le xénope, les cellules S2 de drosophile ou les cellules humaines, ce complexe permet d'augmenter le nombre de microtubules et ainsi participer à la formation de fibres-K et l'alignement des chromosomes (Goshima et al., 2008; Uehara et al., 2009; Petry et al., 2011).



**Figure 9 : Quelques protéines associées aux microtubules (MAPs) et leurs activités**

Représentation de quelques MAPs et leurs rôles sur les microtubules. *In vivo*, les MAPs sont essentielles pour agir sur les paramètres biophysiques des microtubules, ce qui participe à l'assemblage du fuseau mitotique (inspiré de Petry et al., 2016).

## II.B Les MAPs (Microtubule Associated Proteins)

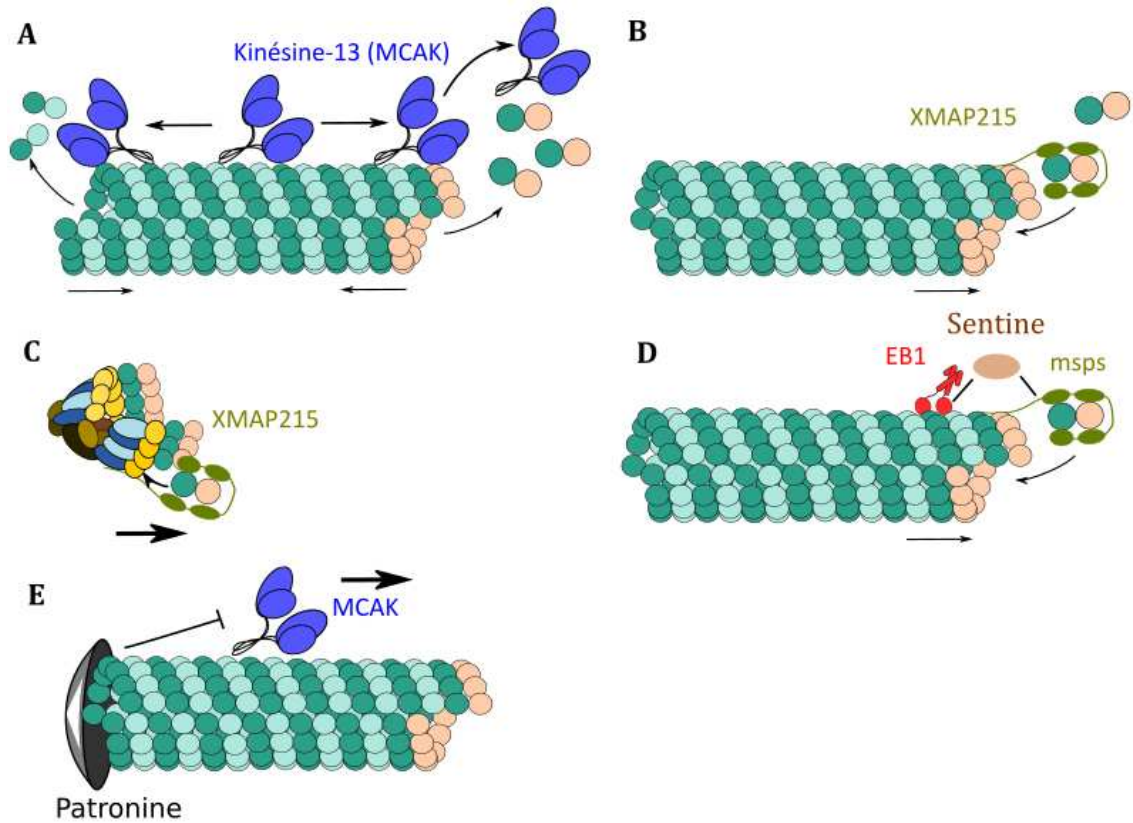
L'étude de la dynamique des microtubules a démontré que pour une même concentration de tubuline, les microtubules polymérisent cinq fois plus vite *in vivo* que *in vitro* et que les phases de sauvetages et de catastrophes sont beaucoup plus fréquentes. Par ailleurs, les microtubules ont une stabilité différente si la cellule est en mitose ou en interphase. En effet, le temps de demi-vie est beaucoup plus court en mitose (entre 30-90 sec) qu'en interphase (environ 15min) (Belmont et al., 1990 ; Desai and Mitchison, 1997).

Ces observations indiquent que des facteurs permettent de réguler la dynamique des microtubules *in vivo*. Ces facteurs sont les protéines associées aux microtubules appelées MAPs (Microtubule Associated Proteins). De nombreuses études avec des approches protéomiques et/ou génétiques, dans différents modèles d'études, ont permis l'identification des protéines associées aux microtubules. Ainsi, plus de 1000 protéines ont ainsi été identifiées pour interagir avec les microtubules, dont une centaine encore non caractérisée jusqu'à aujourd'hui (Petry, 2016). Avec de nombreux cribles, sur des génomes entiers, environ 200 MAPs ont été répertoriées comme essentielles à l'assemblage du fuseau mitotique (Sönnichsen et al., 2005; Goshima et al., 2007; Hughes et al., 2008; Gallaud et al., 2014). L'activité de ces MAPs peut être répertoriée en différents groupes en fonction de leurs activités et leurs localisations (Figure 9). Afin d'organiser les microtubules en un réseau bipolaire fonctionnel, les MAPs agissent sur de nombreux paramètres biophysiques des microtubules. De plus, ces protéines n'agissent pas de manière individuelle mais il y a une véritable coordination de tous ces acteurs afin de réguler l'assemblage du fuseau mitotique.

### II.B.1 Les MAPs agissant à l'extrémité (+) des microtubules

#### a) Les dépolymérases

Les dépolymérases déstabilisent les microtubules en augmentant la fréquence de catastrophe (Howard and Hymann, 2007). La dépolymérase la mieux caractérisée, *in vitro*, est la kinésine-13 MCAK/XKCM1. La déplétion ou la surexpression de la



**Figure 10 : L'activité des MAPs sur la polymérisation des microtubules**

Représentation schématique de quelques exemples de la régulation des extrémités des microtubules par les MAPs.

A) MCAK fait partie de la famille des kinésines 13, c'est une dépolymérase qui se déplace vers les deux extrémités du microtubule

B) XMAP215 une polymérase retrouvée à l'extrémité (+) des microtubules

C) XMAP215 interagit avec la  $\gamma$ -TuRC et participe à l'initiation de la nucléation des microtubules

D) EB1 peut recruter l'homologue de XMAP215 (msps) via la protéine Sentine

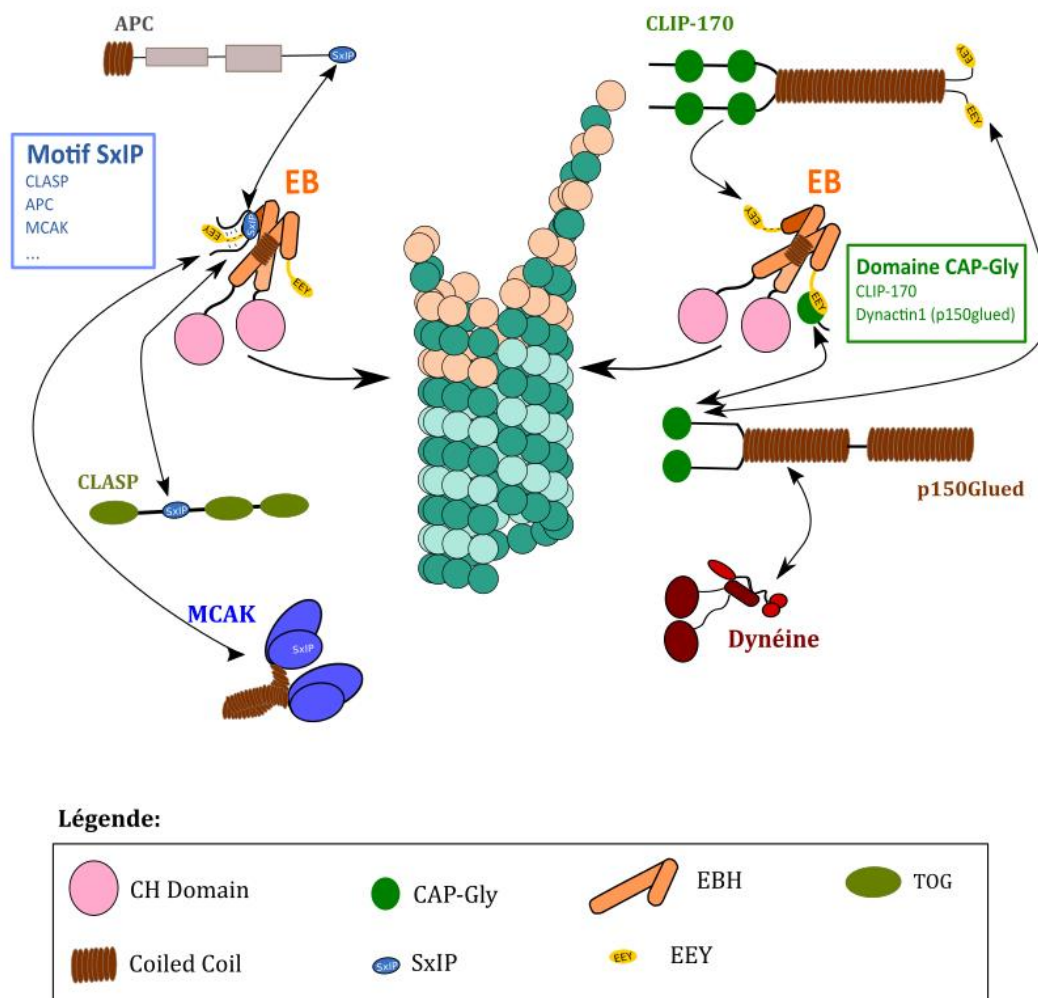
E) La Patronine lie l'extrémité (-) des microtubules et permet d'inhiber l'activité de MCAK à cette extrémité.

kinésine-13 dans des œufs de xénope induit des fuseaux mitotiques respectivement plus longs ou plus courts (Walczak et al., 1996, Tournebize et al., 2000; Maney et al., 2001; Rogers et al., 2004). De plus, cette kinésine 13 joue des rôles importants dans la correction des erreurs d'attachements des microtubules avec les kinétochores, la congression et la ségrégation des chromosomes (Maney et al., 1998; Walczak et al., 2002; Cassimeris and Morabito, 2004; McClung and Walczak, 2010). Comparés aux autres kinésines, les membres de cette famille de kinésines ne se déplacent pas de manière directionnelle le long des microtubules. *In vitro*, MCAK atteint les deux extrémités des microtubules. (Figure 10A) (Cooper et al., 2010; Oguchi et al., 2011).

L'inhibition de la kinésine-8 induit des phénotypes très semblables avec une élongation du fuseau mitotique et des microtubules très stables (Goshima et al., 2005; Mayr et al., 2007; Savoian and Glover 2010). Il est intéressant de préciser que ces kinésines dépolymérisent les microtubules longs plus vite que les microtubules courts, les auteurs ont appelés ce phénomène, l'effet « antenne ». C'est un phénomène selon lequel les microtubules les plus longs accumulent plus de moteurs moléculaires que les microtubules courts. L'accumulation de ces moteurs à l'extrémité (+), entre autre la kinésine-8 (qui a une haute processivité) va provoquer le relâchement des hétérodimères de tubulines (Varga et al., 2006, Varga et al., 2009).

## **b) Les polymérases**

En opposition aux dépolymérases, les polymérases vont permettre la croissance des microtubules en augmentant la vitesse de polymérisation et/ou la fréquence de sauvetage. Les protéines de la famille XMAP215/ch-TOG/msps catalysent la polymérisation des microtubules à l'extrémité (+) en ajoutant successivement des hétérodimères d' $\alpha/\beta$  tubulines au sein du microtubule. De ce fait, la déplétion de cette protéine induit des défauts tels que : (1) une diminution de la taille des fuseaux mitotiques dans de nombreux organismes (Cullen et al., 1999; Tournebize et al., 2000; Goshima et al., 2005; Garcia et al., 2001; Cassimeris and Morabito 2004); (2) une perte de l'interaction entre les microtubules et le cortex cellulaire (Hestermann and Gräf.



**Figure 11 : L'organisation de l'extrémité (+) des microtubules**

Représentation schématique de différentes protéines et domaines impliqués dans l'organisation du microtubule à l'extrémité (+). Les protéines **EBs** (End Binding Proteins) jouent un rôle majeur dans le recrutement de certaines protéines à l'extrémité (+) des microtubules en phase de polymérisation. EB reconnaît le domaine CAP-Gly (à droite: **CLIP-170** et **p150<sup>Glued</sup>**) et les protéines avec un motif SxIP (à gauche: **CLASP**, **APC** et **MCAK**). Les pointes des flèches indiquent les domaines ou motifs interagissant entre eux. Les différents domaines représentés sont précisés dans la légende (EBH: End Binding Homology; CH: Calponin Homology; TOG: Tumor Of Growth; CAP-Gly: Cytoskeleton Associated Protein Gly-rich; CLIP-170: Cytoplasmic Linker Protein 170; CLASP: CLIP-associated proteins).

2004) ainsi que (3) des fuseaux mitotiques dont l'organisation des microtubules est affectée (Gergely et al., 2002). Les membres de la famille XMAP215 possèdent des domaines TOG (Tumor Overgrowth Gene) qui permettent la liaison avec les hétérodimères d' $\alpha/\beta$  tubulines. Le nombre de ces domaines TOG est dépendant de chaque espèce et varie de deux à cinq (Al-Bassam and Chang, 2011). La protéine se lie à la tubuline avec une stœchiométrie de 1:1, ce qui signifie que la protéine ne peut pas se lier à plusieurs dimères de tubuline en même temps. De plus XMAP215 reste pendant de longues périodes à l'extrémité (+) du microtubule, ce qui permet de catalyser l'addition des hétérodimères de tubuline (Figure 10B) (Brouhard et al., 2008). Du fait de sa localisation et de son activité, XMAP215 est considérée comme une +TIPs (+ end Tacking proteins) (Akhmanova and Steinmetz, 2015) (Section suivante).

XMAP215 est également recruté au niveau des centrosomes avec son partenaire TACC3, ceci est essentiel pour favoriser l'initiation de la polymérisation des microtubules (Peset and Vernos 2008). Récemment, il a été démontré que XMAP215 lie directement la  $\gamma$ -TuRC grâce à son domaine C-ter, permettant à ces protéines d'agir synergiquement pour l'initiation de la nucléation des microtubules (Figure 10C) (Thawani et al., 2018).

### *c) Les +TIPs (+ end Tacking proteins)*

#### *c1) Les domaines et motifs des +TIPs impliqués dans la régulation de l'extrémité (+)*

L'extrémité (+) des microtubules est le lieu d'interaction entre de nombreuses protéines appelés +TIPs (+ end Tracking Protein) (Figure 11). Les protéines ayant un rôle central dans la régulation complexe de l'extrémité (+) sont les membres de la famille EBs (End-binding proteins). Ces EBs interagissent avec de nombreuses protéines aux structures et fonctions diverses. Chez l'humain il existe 3 protéines EBs (EB1, EB2, EB3) (Ferreira et al., 2013). Les EBs contiennent un domaine CH (Calponin Homology domain) en N-ter suivi par une région variable et un domaine coiled-coil (Hayashi et al., 2003). Le domaine coiled-coil sert à l'homo ou l'hétérodimérisation des monomères EB. En C-ter les EBs possèdent un motif EEY/F conservé qui permet le recrutement de nombreux partenaires (De Groot et al., 2010). Le domaine CH et la région variable

suffisent à localiser EB à l'extrémité (+) du microtubule (Xia et al., 2014). Les protéines de la famille EBs lient le microtubule au niveau de l'extrémité (+) mais uniquement lors des phases de polymérisation (Maurer et al., 2014). Les protéines EBs servent de plateforme de recrutement pour de nombreuses +TIPs. Ces recrutements se font principalement grâce à deux types de motifs. Les protéines avec le motif SxIP (APC et MCAK), où x peut être n'importe quel acide aminé (Honnappa et al., 2009). D'autres protéines possédant un domaine CAP-Gly (CLIP-170, CLASP2, la sous unité p150<sup>Glued</sup> de la dynéine-dynactine) peuvent reconnaître le motif EEY/F-COO<sup>-</sup> à l'extrémité C-ter d'EB (Slep, 2010) (Figure 11). Récemment, une nouvelle séquence protéique a été identifiée pour interagir avec les protéines EBs : LxxPTPh. Cette séquence est retrouvée dans certaines protéines telles que TACC1, MACF1. Ce nouveau motif d'interaction augmente encore la complexité de la régulation et l'organisation de l'extrémité (+) des microtubules (Kumar et al., 2017).

## c2) L'organisation des +TIPs

Comme nous l'avons vu les +TIPs s'organisent essentiellement via les EBs. Dans cette partie, nous détaillerons quelques exemples de régulation à l'extrémité (+) et l'impact des +TIPs sur les microtubules.

La kinésine MCAK est retrouvée préférentiellement sur les microtubules en phase de polymérisation, cette interaction repose sur les protéines EBs. *In vitro*, un membre de la famille EB est capable de lier MCAK (EB3), ce qui augmente le recrutement de MCAK sur le microtubule (Montenegro Gouveia et al., 2010). La présence conjointe de MCAK et EB3 à l'extrémité (+), induit des changements rapides entre polymérisation et dépolymérisation (Montenegro Gouveia et al., 2010). Cette activité à l'extrémité (+) est très importante pour favoriser la liaison entre les microtubules et les kinétochores pendant la mitose (Domnitz et al., 2012).

Chez le xénope, EB1 et XMAP215 sont nécessaires pour la polymérisation des microtubules et l'assemblage du fuseau mitotique (Kronja et al., 2009). Alors que XMAP215 est présente à la fois lors des phases de polymérisation et dépolymérisation des microtubules, EB1 est seulement présente durant la phase de croissance et à

l'extrémité (+) des microtubules (Maurer et al., 2014, Guesdon et al., 2016). Séparées, ces protéines ont peu d'effet sur la polymérisation des microtubules mais associées, elles agissent synergiquement pour reconstituer, *in vitro*, la vitesse physiologique de croissance des microtubules observée chez le xénope (Zanic et al., 2013). Cependant EB1 et XMAP215 n'interagissent pas directement *in vitro* (Kronja et al., 2009). Dans des cellules S2 de *Drosophila melanogaster*, l'homologue de XMAP215 (minispindle : msps) nécessite EB1 mais aussi la protéine Sentine (une protéine recrutée par EB1) pour être localisée à l'extrémité (+) des microtubules (Figure 10D) (Li et al., 2012). De la même manière, chez l'humain SLAIN2 et EB1 participent à la localisation de ch-TOG (l'homologue humain de XMAP215) à l'extrémité (+) (Van der Vaart et al., 2012).

CLIP-170 ainsi que la sous-unité p150<sup>Glued</sup> de la dynéine-dynactine possèdent aussi des domaines CAP-Gly. CLIP-170 s'associe avec les oligomères de tubuline à l'extrémité (+) (Bieling et al., 2008), ce qui contribue au sauvetage des microtubules alors que p150<sup>Glued</sup> supprime les catastrophes (Komarova et al., 2002; Arnal et al., 2004; Lazarus et al., 2013).

Une autre famille est retrouvée à l'extrémité (+) des microtubules, les CLASPs (CLIP associated proteins). Les CLASPs possèdent un domaine TOG en N-ter, deux autres domaines divergents TOG-like et un domaine CLIP-170 en C-ter (Slep and Vale. 2007). Par conséquent, ces protéines peuvent directement lier les microtubules et s'accumuler à l'extrémité (+) par leurs liaisons avec EB. Les protéines CLASPs ont des fonctions très conservées, elles interviennent dans le sauvetage et la suppression des catastrophes en favorisant la stabilisation et la repolymérisation des microtubules via le recrutement de tubuline (Maiato et al., 2003; Hannak and Heald., 2006; Brouhard and Rice, 2014). En effet, la perte d'activité de CLASP provoque de nombreux défauts mitotiques entraînant des fuseaux monopolaires où les chromosomes sont localisés au niveau du centrosome (Maiato et al., 2005; Inoue et al., 2004). Les CLASPs se localisent à la périphérie des kinétochores favorisant la polymérisation et la stabilité des microtubules kinétochoriens (Wan et al., 2009).

### II.B.2) Les MAPs agissant à l'extrémité (-)

Comparé aux +TIPs, les protéines qui s'associent avec l'extrémité (-) des microtubules sont moins étudiées. Pourtant depuis longtemps des protéines sont connues pour prévenir leurs dépolymérisations et/ou leurs croissances.

La Patronine est une protéine initialement identifiée dans un crible ARNi chez la drosophile. Chez la drosophile, la Patronine est importante pour réguler l'extrémité (-) des microtubules en interphase et en mitose. En effet, l'inhibition de la Patronine montre une réduction du nombre de microtubule en interphase et une diminution de la taille du fuseau mitotique (Goshima et al., 2007; Pavlova et al., 2019). La Patronine lie les microtubules en phase de polymérisation au niveau de l'extrémité (-), *in vivo et in vitro*. Ceci permet de protéger les microtubules de la dépolymérisation induite par la kinésine-13 (Figure 10E) (Godwin and Vale., 2010; Wang et al., 2013). Cependant le mécanisme par lequel la Patronine reconnaît et protège l'extrémité (-) reste à mettre en évidence.

De la même façon, une autre protéine MCRS1 (Microspherule Protein 1) localise à l'extrémité (-) des microtubules et pourrait également contrebalancer également l'action de la kinésine-13 (Meunier et al., 2011). Enfin, le complexe  $\gamma$ -tubuline (Section I.A.4.a), en plus d'être une matrice de nucléation, permet d'augmenter la stabilité des extrémités (-) (Anders and Sawin, 2011).

### II.B.3) Les MAPs clivant les microtubules

Le clivage des microtubules a été décrit pour la première fois chez le xénope (Vale 1991). La première enzyme clivante identifiée est la Katanine (McNally and Vale, 1993). La Katanine appartient à la grande famille des ATPases, associées à diverses activités cellulaires (AAA ATPases). La katanine est composée d'une sous unité catalytique (p60) et d'une sous unité régulatrice (p80) qui forment un complexe stable *in vivo* (McNally and Vale; Wang et al., 2017). Les mutants des sous-unités (p80) et (p60) induisent les mêmes phénotypes dans différentes espèces, ce qui indique qu'il s'agit d'un mécanisme essentiel (Mains et al., 1990, Sharma et al., 2007, Wang et al., 2017). Il a été montré que la perte de Katanine induit des fuseaux mitotiques et méiotiques plus longs (McNally et al., 2006). Ce phénotype est attribué au fait que la Katanine clive les

microtubules stables au niveau de leurs extrémités (+) (Zhang et al., 2011, Loughlin et al., 2011). D'autres protéines ont été identifiées pour leurs activités de clivage des microtubules telles que la Spastine (Evans et al., 2005; Roll-Mecak and Vale; 2010) et la Fidgetine (Mukherjee et al., 2012).

Récemment, une observation a montré que la Spastine et la Katanine éliminent progressivement les sous-unités de tubuline au niveau de certains sites tout au long du microtubule (Vemu et al., 2018). Ces sites de clivages sont spontanément réparés par l'incorporation de tubuline-GTP, stabilisant ces microtubules. De plus ces sites de tubuline-GTP permettraient le recrutement de certaines protéines qui reconnaissent le GTP (telles que EB1) augmentant ainsi la fréquence de sauvetage des microtubules (Vemu et al., 2018).

#### II.B.4) Les MAPs séquestrant les dimères de tubulines

La Stathmine, ou OP18 (oncoprotéin 18), est l'une des principales protéines déstabilisatrices des microtubules (Cassimeris, 2002 ; Steinmetz et al., 2007). La Stathmine possède deux régions de liaison, chacune capable de lier un hétérodimère de tubuline (Chauvin and Sobel. 2015). Cependant, le mécanisme d'action de la Stathmine reste controversé. Deux modèles sont proposés jusqu'à aujourd'hui : (1) la Stathmine séquestre les dimères de tubuline ce qui favorise la dépolymérisation des microtubules (Howell et al., 1999; Steinmetz et al., 2007; Nouar et al., 2016) et (2) la Stathmine induit des catastrophes en interagissant directement avec le microtubule (Manna et al., 2007, Gupta et al., 2013).

#### II.B.5) Les moteurs moléculaires

##### a) La séparation des centrosomes

Eg5 (Klp61F chez la drosophile) fait partie de la famille des kinésine-5. C'est l'un des moteurs moléculaires le plus étudié, dans de nombreux modèles (Hagan and Yanagida, 1990; Le Guellec et al., 1991; Sawin et al., 1992; Kapitein et al., 2005). Eg5 est un homotétramère dont l'activité motrice est dirigée vers l'extrémité (+), il a la capacité

de ponter deux microtubules antiparallèles, ce qui permet le glissement des microtubules dans des directions opposées. Chez tous les organismes étudiés, l'inactivation d'Eg5 entraîne des fuseaux monopolaires (Ferenz et al., 2010). Ce moteur moléculaire est donc impliqué dans la séparation des centrosomes en prophase ainsi que la formation du fuseau mitotique bipolaire (détaillé dans la section suivante) (Cole et al. 1994, Tao et al., 2006).

La dynéine se dirige vers l'extrémité (-) des microtubules et joue un rôle majeur dans la séparation des centrosomes (Tanenbaum et al., 2008). Sa déplétion entraîne comme Eg5, des fuseaux monopolaires (Gonczy et al., 1999). De plus, Eg5 et la dynéine génèrent des forces antagonistes puisque la double déplétion de ces protéines restaure la séparation des centrosomes (Sharp et al., 2000). Cependant le mécanisme d'action de la dynéine reste sujet à controverse. Dans le premier scénario la dynéine présente au cortex permet d'ancrer les microtubules astraux. Grâce à sa motilité en direction de l'extrémité (-), la dynéine pourrait tirer les microtubules afin de séparer les centrosomes avec l'aide Eg5 (Sharp et al., 2000). Dans le second modèle, la dynéine est localisée au niveau de l'enveloppe nucléaire et tire les centrosomes le long de l'enveloppe nucléaire (Gonczy et al., 1999). Cependant, ces deux modèles ne semblent pas incompatibles : des modélisations proposent que la dynéine permet la séparation des centrosomes en agissant comme un moteur moléculaire à la fois au niveau de l'enveloppe nucléaire et au niveau du cortex en servant de point d'ancrage (De Simone et al., 2016).

Une autre kinésine identifiée dans ce processus cellulaire est Kif15/XKLP2 (kinésine-12) (Tanenbaum et al., 2009). La déplétion de Kif15 n'empêche pas la séparation des centrosomes. Cependant cette kinésine devient essentielle quand Eg5 est inhibé (Tanenbaum et al., 2009; Sturgill et al., 2013).

La kinésine-1 a été identifiée comme une protéine motrice nécessaire pour permettre le transport des déterminants de polarités dans l'ovocyte de drosophile (Januschke et al., 2002; Sung et al., 2008) ou la séparation des noyaux dans les cellules musculaires (Metzger et al., 2012). La kinésine-1 est recrutée par Enscinsine sur les microtubules. Cette protéine permet aussi la séparation des centrosomes en prophase (Gallaud et al., 2014). Le mécanisme par lequel la kinésine-1 sépare les centrosomes

n'est pas connu. Cependant, une étude propose que la kinésine-1 assure la liaison entre les microtubules provenant des centrosomes et le cortex (Winckler et al., 2015).

### *b) La morphologie du fuseau mitotique*

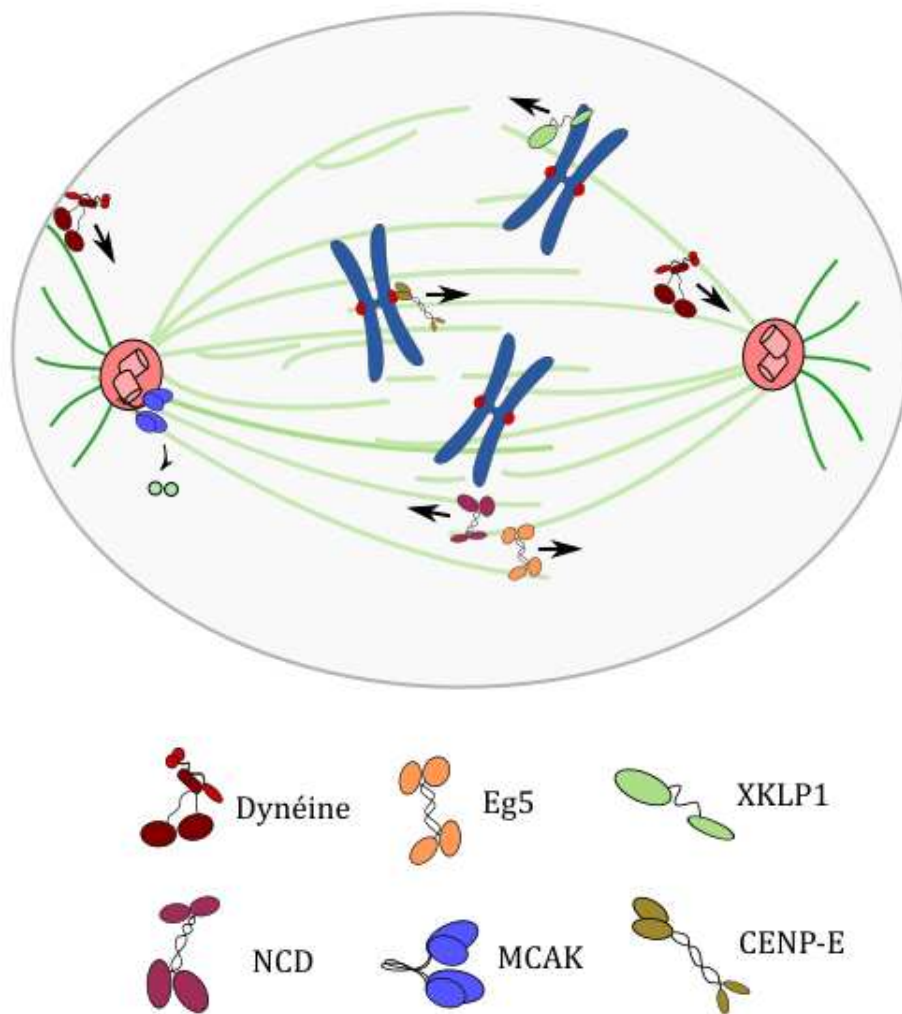
Le glissement des microtubules parallèles va permettre de maintenir la bipolarité du fuseau et de focaliser les pôles au cours de la division. Eg5 semble être le minimum requis afin de participer à la stabilité et le maintien de la bipolarité du fuseau au cours de la division cellulaire (Loughin et al., 2010; Mitchison et al., 2005).

La dynéine participe au glissement des microtubules. Il a été proposé que la dynéine interagisse avec Eg5 et permet de transporter ce moteur au niveau des pôles de la cellule. Cette activité de la dynéine permet de limiter le glissement des microtubules dépendant d'Eg5 au niveau des kinétochores afin de réguler la longueur et l'orientation du fuseau (Uteng et al., 2008). La dynéine permet aussi de focaliser les pôles (Merdes et al., 2000, Goshima et al., 2005).

Cette fonction de focalisation des pôles est partagée par la famille des kinésines-14 (NCD/HSET/KifC1). Ce sont des moteurs dimériques qui se dirigent vers l'extrémité (-) des microtubules (Walker et al., 1990; Karabay and Walker, 1999; Cai et al., 2009). Les résultats supportent un rôle de NCD dans la liaison et le glissement des microtubules parallèles ce qui génère des forces antagonistes à Eg5 (Hentrich and Surrey, 2010).

### *c) Les chromokinésines*

Certaines kinésines des familles 4 (XKLP1) et 10 (XKID) lient directement les bras des chromosomes et les microtubules. Ces kinésines produisent des forces dites « d'éjections polaire », ce qui permet d'éloigner les chromosomes des pôles et de les aligner au niveau de la plaque équatoriale de la cellule (Levesque and Compton., 2001; Mazumdar et al., 2004; Trieselmann et al., 2003).



**Figure 12 : Les moteurs moléculaires dans l'assemblage du fuseau mitotique**

Représentation des différents moteurs moléculaires impliqués dans l'assemblage du fuseau mitotique. Ces moteurs moléculaires se déplacent le long de microtubules et vont permettre le mouvement des microtubules eux-même ou des chromosomes. La direction des différents moteurs est indiquée par une flèche.

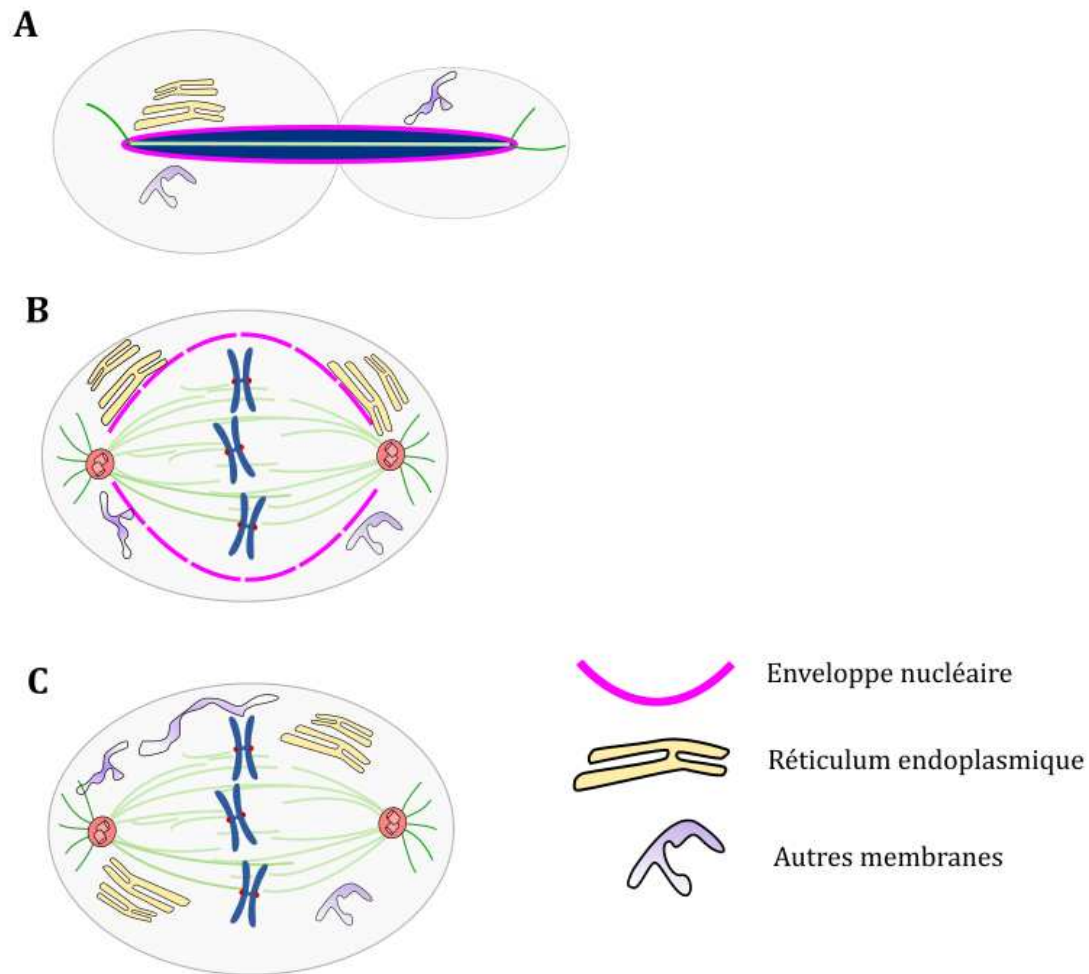
La kinésine-7 (CENP-E) s'accumule sur la plaque externe des centromères et interagit avec des composants clés du kinétochore. Une de ces fonctions est de coopérer avec les kinésines XKLP1 et XKID précédemment citées afin de permettre la congression des chromosomes mono-orientés vers la plaque équatoriale (Iemura and Takana, 2015; Yu and al., 2019).

## II.C La « spindle matrix »

Comme précédemment décrit, la ségrégation des chromosomes est due à la formation du fuseau mitotique composé de microtubules qui s'attachent aux kinétochores des chromatides sœurs et qui sont associés avec de nombreuses protéines. Un concept de compartimentation pendant la mitose a été proposé il y a plus d'un demi-siècle suite à des observations qui montraient que du matériel en plus des microtubules entourait le fuseau mitotique. Ce fuseau mitotique semble être intégré dans « une matrice qui montre des différences considérables avec le cytoplasme » (Mazia, 1967) appelée par la suite la « spindle matrix ».

### II.C.1 La compartimentation durant la mitose

Il y a plusieurs types de compartimentations suivant les espèces. Chez les mammifères, la mitose est dite « ouverte », ce qui signifie que l'enveloppe nucléaire est complètement désassemblée à la transition prophase-prométaphase (De Souza and Osmani, 2009). Cependant chez l'embryon de *drosophile* ou de *C. elegans*, la mitose est décrite comme « semi-ouverte ». C'est à dire que pendant la mitose, il reste une enveloppe nucléaire résiduelle ainsi que des membranes additionnelles. Bien que l'enveloppe nucléaire soit irrégulièrement fenestrée et même ouverte au niveau des pôles, la compartimentation reste importante jusqu'à la métaphase (Figure 13). En effet, une partie de l'enveloppe nucléaire ainsi que la Lamine B reste en place (Beaudouin et al., 2002). L'hypothèse selon laquelle il existe un mécanisme d'exclusion en fonction de la taille des molécules, entre les molécules du cytoplasme et la région du fuseau, a été rejetée (Yao et al., 2012). Chez l'embryon de *drosophile* et *C. elegans*, la tubuline soluble s'accumule rapidement autour des chromosomes après la rupture de l'enveloppe nucléaire, suggérant qu'il s'agit d'un mécanisme actif (Yao et al., 2012; Hayashi et al.,



**Figure 13 : Les différents types de compartimentation**

Différentes formes de mitoses sont apparues au cours de l'évolution chez les eucaryotes. A) Dans les mitoses « fermées » que l'on retrouve chez les eucaryotes inférieurs tels que la levure, *S. cerevisiae*, l'enveloppe nucléaire ne se rompt pas pendant l'assemblage du fuseau mitotique et la ségrégation des chromosomes. Les pôles appelés chez la levure SPB (spindle pole bodies) forment des microtubules cytoplasmiques, interagissant avec le cortex et des microtubules nucléaires interagissant les uns avec les autres et/ou avec les kinétochores des chromosomes. B) Un exemple de mitose semi-ouverte trouvée par exemple chez *D. melanogaster* et *C. elegans*, Les microtubules nucléés à partir des centrosomes envahissent l'espace nucléaire par des ouvertures pour former le fuseau mitotique entouré par l'enveloppe nucléaire résiduelle. C) L'assemblage du fuseau mitotique lors de la mitose ouverte, retrouvée chez les vertébrés, s'accompagne d'un désassemblage complet de l'enveloppe nucléaire lors de la proméphase.

2012). Une autre hypothèse a été proposée selon laquelle les protéines de la « spindle matrix » lient d'autres substrats encore non identifiés dans le but de les accumuler dans cette région. Les constituants de la matrice formeraient donc une transition de phase dans le but d'accumuler certaines protéines essentielles à l'assemblage du fuseau mitotique pendant la mitose (Yao et al., 2012). Plus récemment, une étude a montré que ce système permet d'exclure certains organelles membranaires de la région du fuseau (Schweizer et al., 2015).

### II.C.2 La composition protéique de la « spindle matrix »

La nature exacte de la « spindle matrix » reste jusqu'à aujourd'hui mal connue. Avec des expériences combinées de protéomiques, génétiques et de biologie cellulaire, des protéines ont été associées avec cette « matrice » dans divers systèmes et avec des fonctions mitotiques différentes que l'on peut classer en deux catégories : 1) un réseau de protéines retrouvées avec le fuseau et 2) une membrane riche en lamine qui entoure le fuseau et qui permet une compartimentation entre la région du fuseau mitotique et le cytoplasme.

Chaque protéine accumulée au sein de la « spindle matrix » reste dans une structure fusiforme après que les microtubules soient dépolymérisés par des drogues spécifiques. Cette observation suggère que la mise en place de cette structure est indépendante du fuseau mitotique. Un complexe de quatre protéines a été isolé pour être accumulé dans la « spindle matrix » chez la drosophile. La première protéine identifiée était Skeletor, elle est associée aux chromosomes en interphase puis se redistribue en une structure fusiforme dès la prophase (Walker et al., 2000). Grâce à des expériences de double hybride chez la levure, trois protéines partenaires de Skeletor ont été par la suite caractérisées : Chromator, Mégator et EAST (Rath et al., 2004; Qi et al., 2004; Qi et al., 2005). Comme Skeletor, ces protéines sont localisées dans le noyau en interphase et se réorganisent dans la région du fuseau mitotique pendant la mitose. La déplétion de ces protéines entraîne des défauts d'assemblage du fuseau mitotique et/ou un SAC défectueux (Wasser and Chia, 2003; Qi et al., 2004; Ding et al., 2009). Chromator est capable de se lier directement aux microtubules grâce à son domaine de liaison aux microtubules. Mégator quant à lui interagit indirectement avec Asator, une kinase qui lie

le fuseau mitotique (Qi et al., 2009; Yao et al., 2012). Mégator est la seule des quatre protéines à avoir un orthologue chez les mammifères, Tpr (Translocated promoter region), une protéine du pore nucléaire. À part la fonction de ces protéines dans l'assemblage du fuseau mitotique, un des rôles de Mégator/Tpr est de faciliter le recrutement de protéines du SAC (Mad1 pour Mitotic Arrest Deficient 1 et/ou Mad2 Section III.B.2). (Lee et al., 2008, Lince-Faria et al., 2009, Schweizer et al., 2013). Ces études représentent les premières descriptions de la « spindle matrix ».

L'isoforme 3 de la lamine (LB3) conserve une structure fusiforme dans des œufs de xénope, en dépit de l'absence de microtubule. La lamine B fait partie de la famille des filaments intermédiaires, cette protéine semble essentielle dans la mise en place du fuseau mitotique après la rupture de l'enveloppe nucléaire (Beaudouin et al., 2002; Tsai et al., 2006). En effet, une fraction de la Lamine B est associée avec l'appareil mitotique ainsi que de nombreux SAFs (TPX2, NuMA, Eg5, XMAP215, la dynéine, Nude1 et BuGZ) qui ont tous des rôles essentiels dans l'assemblage du fuseau mitotique (Paddy et al. 1996; Tsai et al., 2006 ; Ma et al., 2009).

D'autres régulateurs importants de la mitose sont retrouvés dans la « spindle matrix » et gardent cette localisation malgré la dépolymérisation des microtubules telles que la Cycline B, Polo ou Mad2 (Jiang et al., 2014; Moutinho-Santos et al., 1999; Raff JW et al., 2002; Lince-Faria et al., 2009; Yao et al., 2018). De plus, au moins deux protéines du pore nucléaire Nup107 et Nup153 sont retrouvées dans la matrice chez la drosophile (Katsani et al., 2008).

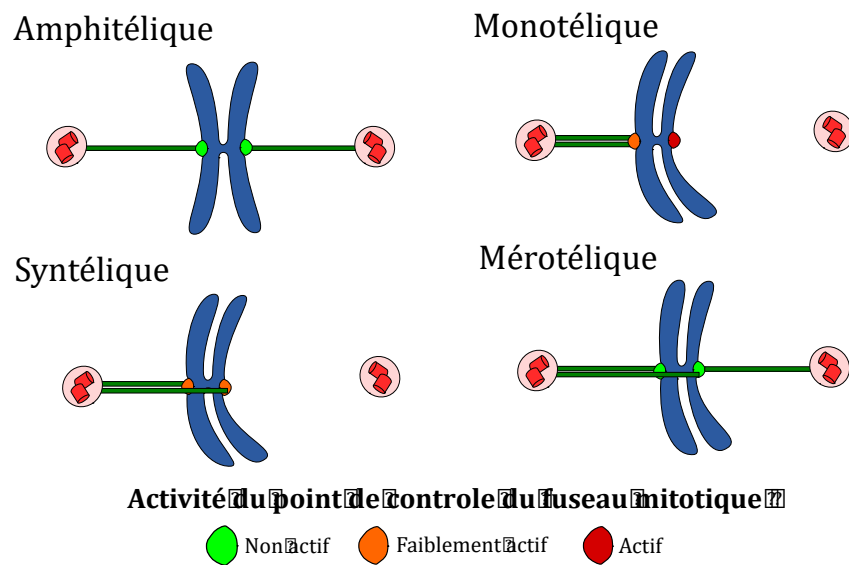
### **II.C.3 La mise en place de la « spindle matrix »**

Mégator (un composant de la « spindle matrix ») et BugZ (un SAF) possèdent tous les deux des régions de faibles complexités qui permettraient aux protéines de s'autoassembler, constituant ainsi une transition de phase (Tsai et al., 2006; Ma et al., 2009; Yao et al., 2012). Cette hypothèse a été validée *in vitro* avec la protéine BuGZ, confirmant ainsi que des protéines de la « spindle matrix » sont capables de s'autoassembler via un mécanisme sensiblement similaire au PCM des centrosomes (Jiang et al., 2015, Woodruff et al., 2016) (Section I.B.3). La transition de phase

dépendante de BugZ permet de concentrer la tubuline ce qui favorise la polymérisation des microtubules (Jiang et al., 2015). De plus, l'activité de la « spindle matrix » semble plus variée car BuGZ permet aussi le recrutement et l'activation de la kinase mitotique Aurora A (Huang et al., 2018).

Des expériences permettent de fortement supposer que le gradient Ran joue un rôle essentiel dans la formation de la « spindle matrix », chez les vertébrés ou la drosophile. Dans des oeufs de Xénopes, Ran est essentiel pour l'assemblage de la Lamine B (Tsai et al., 2006). De plus, l'injection d'une protéine de Ran dominant négatif dans des embryons de drosophiles, perturbe la localisation de la protéine Skeletor (Silverman-Gavrila and Wilde, 2006). Plus récemment, il a été montré que le gradient Ran-GTP est essentiel pour permettre la dissociation de BuGZ et Bub3 en métaphase permettant l'entrée en anaphase (Jiang et al., 2014). Par conséquent, ces données préliminaires nous permettent de soupçonner un rôle direct de Ran dans la formation de la « spindle matrix ». Cependant il est important de préciser que lorsque que l'on compare le gradient Ran-GTP entre les cellules humaines Hela (mitose ouverte) et les cellules S2 de drosophile (mitose semi-ouverte) en utilisant des senseurs FRET, le gradient Ran-GTP est beaucoup plus fort dans les mitoses de drosophiles, ce qui indique que le degré de compartimentation est différent entre les cellules humaines et de drosophiles (Moutinho-Pereira et al., 2013).

Nos connaissances incomplètes sur la nature exacte de la structure, la fonction et la composition de cette « spindle matrix » en font un sujet controversé. La découverte de nouvelles protéines associées à cette matrice permettrait de mieux caractériser ses propriétés structurelles et son rôle dans l'assemblage du fuseau mitotique.



**Figure 14 : Les différents types d'attachement des microtubules**

L'attachement amphitélrique est l'attachement qui permet de ségréger correctement les chromatides sœurs. Les attachements monotéliques et syntéliques ne satisferont pas le SAC qui bloque l'entrée en anaphase afin de corriger les défauts d'attachements. Dans le cas de l'attachement mérotélrique, le SAC est satisfait et n'empêche pas l'entrée en anaphase.

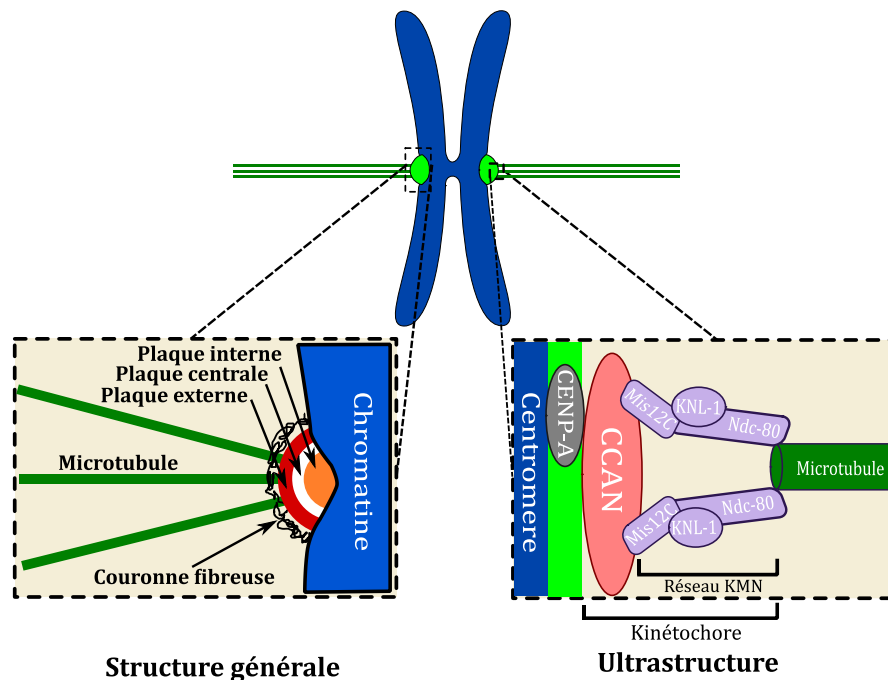
### III. Le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique

Précédemment, nous avons vu comment le fuseau mitotique était assemblé afin de permettre la fine et précise ségrégation des chromosomes. La mauvaise transmission du matériel génétique entre les deux cellules filles mène à la perte d'information génétique ou à l'aneuploïdie, un état où les cellules se retrouvent avec un nombre aberrant de chromosomes. Afin d'éviter les erreurs de ségrégation des chromosomes, un système de surveillance, le SAC (Spindle Assembly Checkpoint), permet de vérifier que les kinétochores (de larges complexes protéiques qui s'assemblent au niveau de l'ADN centromérique) sont correctement attachés par les microtubules et de retarder la progression en anaphase si nécessaire.

#### III.A Les différents types d'attachement

Les microtubules peuvent lier les kinétochores à partir des deux pôles des fuseaux mitotiques, pouvant mener à plusieurs configurations d'attachements possibles. Dans le cas d'un attachement amphitélétique, les deux kinétochores du chromosome sont attachés par les deux pôles opposés du fuseau mitotique, le chromosome est donc bi-orienté. En revanche, lors d'un attachement monotélétique, un seul kinétochore est attaché par un seul pôle, le chromosome est dit mono-orienté. Lors de l'attachement de type syntélétique, les deux kinétochores sont attachés mais seulement par un pôle de la cellule. Finalement, l'attachement mérotélétique correspond à un kinétochore attaché par les deux pôles du fuseau mitotique (Figure 14).

Les chromatides sœurs sont liées par le complexe cohésine jusqu'au début de l'anaphase. Les microtubules tentent de tirer les chromosomes de chaque côté, induisant des tensions dans le cas d'attachements amphitéliques ce qui inactive le SAC. Lors d'attachements monotéliques ou syntéliques, des tensions sont exercées d'un seul côté menant à un maintien du SAC actif. En revanche, le SAC n'est pas capable de détecter les attachements mérotéliques, parce que des tensions sont exercées en direction des deux pôles de la cellule sur chaque kinétochore (Musacchio and Salmon. 2007) (Figure 13).



**Figure 15 : Structure et l'ultrastructure du kinétochore**

À gauche, la structure général d'un kinétochore qui est assemblé au niveau du centromère de chaque chromatide. Le kinétochore est une structure trilamellaire composé de différentes plaques (interne, centrale, externe) et d'une couronne fibreuse. À droite, l'ultrastructure du kinétochore et les différentes protéines recrutées. Au cœur du kinétochore CENP-A (Centromeric Protein A) et un groupe de protéines appelées CCAN (Constitutive Centromere Associated Network). Le groupe de protéines appelées KMN (KNL-1/Mis12C/Ndc-80) de la région externe du kinétochore permet l'interaction avec le microtubule est composé de MisC12, KNL-1, Ndc-80. Ndc-80 via son domaine CH (Calponin Homology) interagit avec le microtubule.

### III.B Les Kinétochores et le SAC

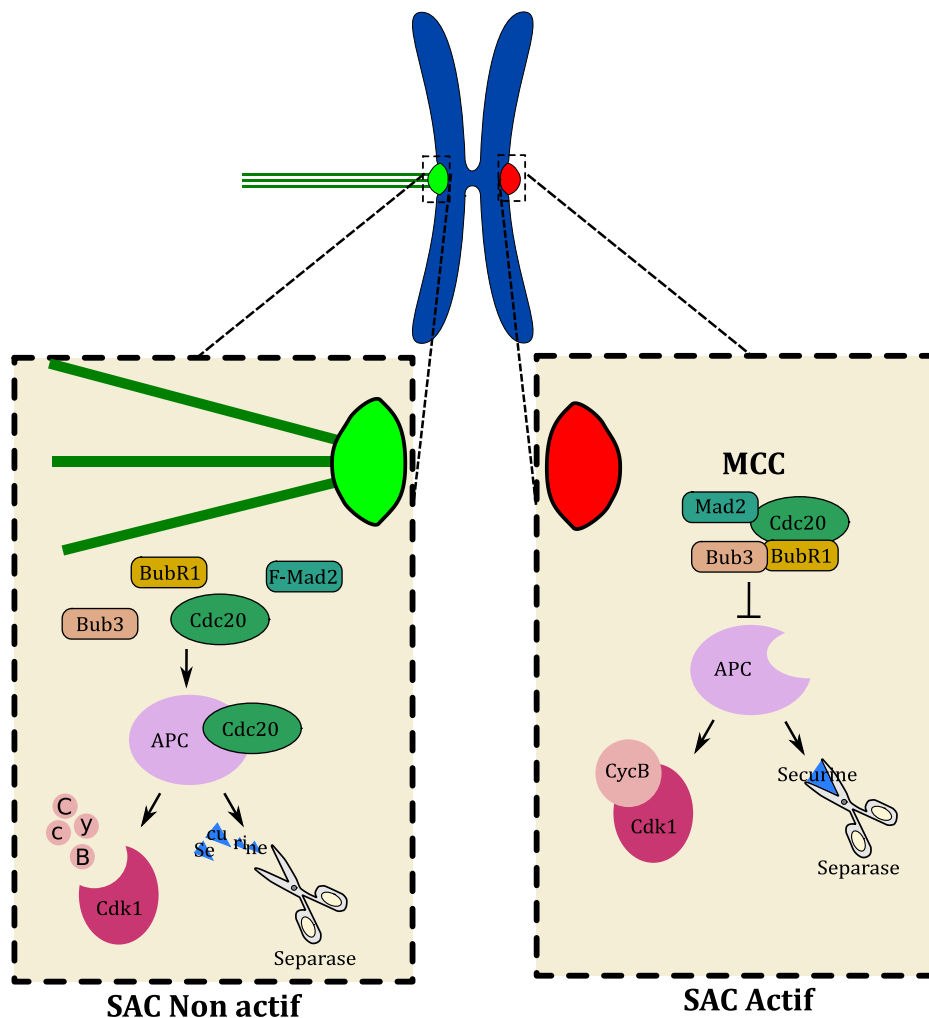
#### III.B.1 L'ultrastructure du kinétochore et sa liaison avec les microtubules

Les kinétochores sont constitués de complexes protéiques composés d'au moins 80 protéines différentes. Ces complexes sont présents dans différentes régions du kinétochore, appelées régions internes et externes, qui sont assemblées au niveau des centromères de chaque chromatides sœurs (Santaguida and Musacchio, 2009). Au cœur du kinétochore, un variant de l'histone-H3, CENP-A (Centromeric Protein A) ainsi que plusieurs autres composants seront recrutés tout au long du cycle cellulaire, formant un complexe appelé le CCAN (Constitutive Centromere Associated Network) (Cleveland et al., 2003). D'autres protéines sont retrouvées au niveau de la région externe du kinétochore formant un réseau KMN (KNL-1/Mis12C/Ndc-80) qui est constitué de sous complexe comme le KNL-1 (Kinetochore null protein1), Mis12C (Missegregation 12) et Ndc-80 (Nuclear division cycle 80). Ces protéines servent de plateforme pour les protéines du SAC ou encore pour permettre la liaison avec les microtubules au travers du domaine CH (Calponin-homology) de Ndc-80 (Cleveland et al. 2003, Chan et al., 2005, DeLuca et al., 2006) (Figure 14).

#### III.B.2 La régulation du SAC par le kinétochore

Lorsque les chromosomes sont correctement attachés par les microtubules, le SAC est dit « satisfait » et va activer l'APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) qui entraîne la dégradation de la cycline B1 et de la Sécurine. Par conséquent, la Séparase n'est pas inhibée et peut cliver les cohésines, entraînant la séparation des chromatides sœurs. La dégradation de la cycline B permet la sortie de mitose.

En revanche, un kinétochore non attaché génère un signal, le SAC est « insatisfait ». Ce signal inhibe l'APC/C grâce au MCC (Mitotic Checkpoint Complex) composé de Mad2, BubR1, Bub3 et Cdc20. L'inhibition de l'APC/C passe principalement par la séquestration du facteur Cdc20 indispensable à l'activité de l'APC/C. Le MCC séquestre Cdc20 empêchant ainsi de lier ses substrats (Alfieri et al., 2016). Ainsi, la cycline B et la sécurine ne sont pas dégradées retardant la sortie de mitose (Figure 16).



**Figure 16 : Le point de contrôle du fuseau mitotique (SAC : Spindle Assembly Checkpoint)**

Lorsque tous les kinétochores sont attachés par les microtubules le SAC est dit « satisfait » (à gauche). L'APC/C est une ubiquitine ligase qui permet la sortie de mitose et la séparation des chromatides sœurs par la polyubiquitination de la Cycline B et la Sécurine, menant à leurs dégradations par le protéasome. En revanche, lorsqu'un kinétochore est mal ou non attaché par le fuseau mitotique, le SAC est dit « insatisfait » (à droite) et va émettre un signal. Le kinétochore va recruter des protéines pour former le MCC (Mitotic Checkpoint Complex) composé de Mad2, cdc20, Bub3 et BubR1. Le MCC inhibe l'activité de l'APC, ce qui stabilise la cycline B et la Sécurine empêchant la sortie de mitose (Dick and Gerblich. 2015) (à droite).

## IV. Contexte et objectifs

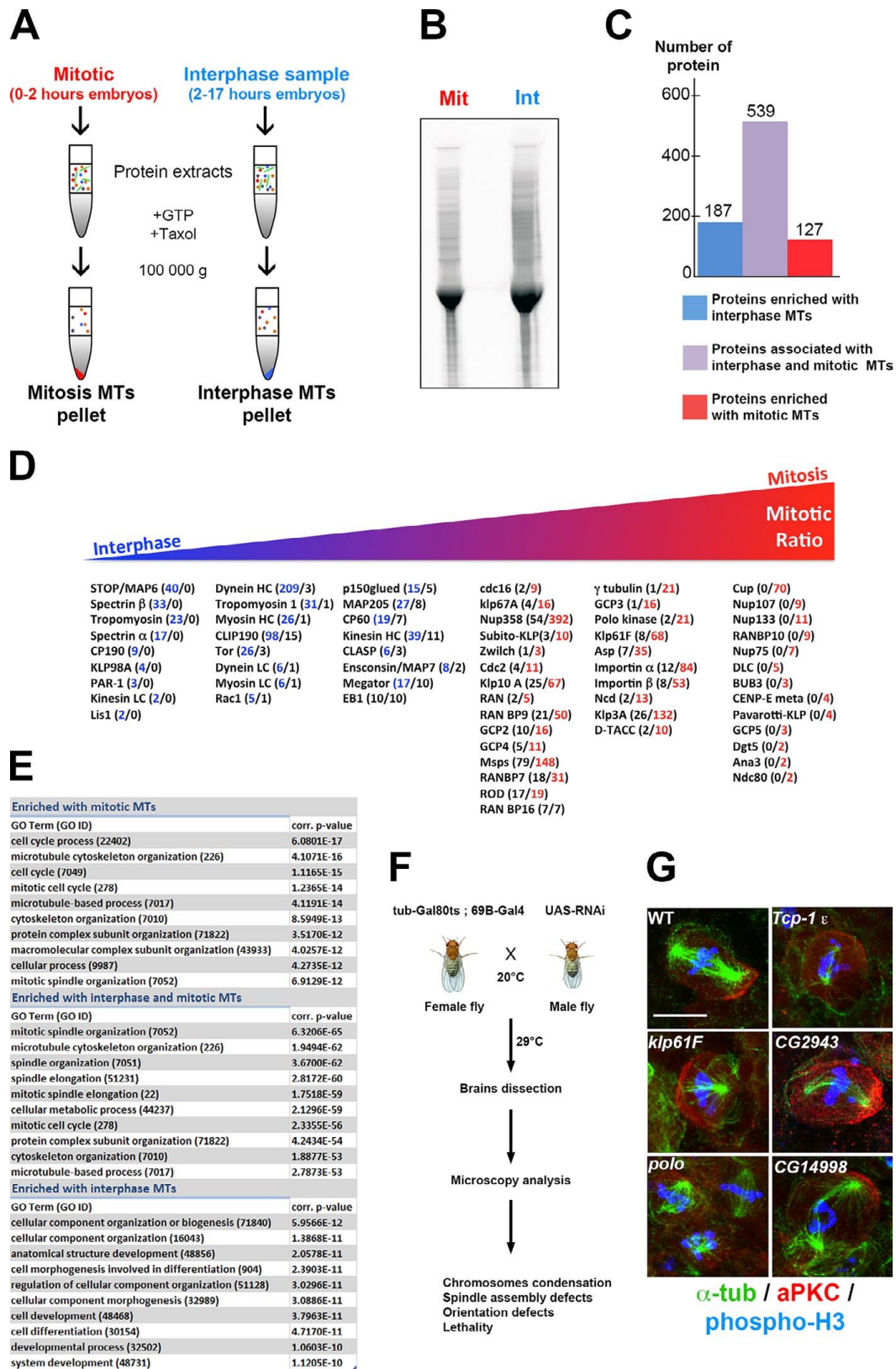
La compréhension des mécanismes d'assemblage du fuseau mitotique est l'objet de nombreux travaux depuis sa première description faite par Flemming dans une cellule animale en 1882. L'assemblage de cette structure est complexe car elle est composée de nombreux microtubules (pouvant aller jusqu'à des centaines de milliers) qui sont les principaux constituants. De plus, environ 1000 MAPs différentes en assurent la fonction dont une centaine d'entre elles sont encore non caractérisées à ce jour (Petry et al., 2016).

Une des principales thématiques de notre équipe est l'étude fonctionnelle et l'identification de nouveaux acteurs impliqués dans l'assemblage du fuseau mitotique chez un organisme modèle, la drosophile. La drosophile est un modèle de choix pour les expériences de génétiques et de biologie cellulaire et est utilisée depuis plus d'un siècle. Cet organisme est facile à manipuler (cycle de vie, génome simple ...) et de façon intéressante, 50% des protéines retrouvées chez la drosophile ont des orthologues fonctionnels chez les mammifères. Une étude protéomique a permis à l'équipe d'analyser l'interactome des protéines interagissant avec les microtubules chez l'embryon de drosophile (Gallaud et al., 2014). Dans cette étude, notre équipe a comparé des extraits d'embryons de 0-2h, qui se divisent de façon rapide et synchrone (extraits « mitotiques ») avec des échantillons d'embryons plus vieux (0-17h), dans lesquels la majorité des cellules ne se divisent pas (extrait « interphasique »). Le but est de pouvoir comparer des différences d'affinités entre les microtubules en interphase et en mitose pour les MAPs identifiées. La polymérisation des microtubules a été induite avec du taxol additionné de GTP puis les microtubules et les MAPs ont ensuite été récupérées par centrifugation (Figure 17A) et résolus par SDS-PAGE (Figure 17B). Une analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier 855 protéines dans les deux échantillons. Les protéines ont ensuite été classées en trois catégories en fonction de leurs profils enrichissements : mitotique, interphasique ou les deux (Figure 17C-17E). Par la suite, 96 gènes pour lesquels aucun rôle dans l'assemblage du fuseau mitotique n'est connu ont été sélectionnés. Chez la drosophile il est facile d'exprimer des ARNi dans le SNC (Système Nerveux Central) grâce au système UAS-Gal4 (Brand et Perrimon, 1993) et de regarder l'impact sur les cellules souches, les Neuroblastes (Nbs). Grâce à l'expression

de ces ARNi, un crible protéique a été effectué. C'est ainsi que 18 candidats ont été retenus car leurs pertes de fonctions induisent des phénotypes mitotiques tels que : l'hypercondensation des chromosomes, des défauts dans l'assemblage du fuseau mitotique et/ou une perte de l'orientation du fuseau mitotique (Figure 17G).

Une protéine retenue suite au crible est dTBCE. Cette protéine semble être associée aux microtubules uniquement en mitose (4 peptides identifiés en mitose contre 0 en interphase). L'inhibition de TBCE dans le SNC de la drosophile mène à une augmentation de l'index mitotique, ce qui suggère une activation prolongée du SAC. De plus, lorsque TBCE est inhibée, les fuseaux mitotiques des Nbs possèdent une faible densité de microtubules. Pendant ma thèse, j'ai principalement travaillé sur le rôle de cette protéine dans l'assemblage fuseau mitotique.

Un autre projet auquel j'ai participé est l'étude d'Ensconsine (également connu sous le nom de MAP7). Cette protéine a été précédemment décrite par l'équipe pour son rôle dans l'assemblage du fuseau mitotique (contrôle de la longueur du fuseau). De plus, Ensconsine est impliquée dans la séparation des centrosomes en interphase. La séparation des centrosomes est dépendante du recrutement de la kinésine-1. En revanche le contrôle de la longueur du fuseau mitotique par Ensconsine est indépendant de la kinésine-1 (Gallaud et al., 2014). Ensconsine possède deux domaines, un domaine de liaison aux microtubules (MBD) et un domaine de liaison à la kinésine-1 (KBD). Nous avons donc tenté de séparer ces deux fonctions en exprimant : 1) le MBD, pour obtenir des drosophiles où la longueur du fuseau est normale mais les centrosomes sont mal séparés. 2) le KBD pour espérer sauver la séparation des centrosomes mais pas la longueur du fuseau. Les résultats se sont avérés différents de ce que nous avions envisagé. Cependant, cette étude nous a permis de mettre en évidence une double activation de la kinésine-1 par Ensconsine dans différents tissus et à différents stades du développement.



**Figure 17 : L'interactome des microtubules chez l'embryon de drosophile (Figure S1 Gallaud et al., 2014).**

Légende au dos

A) Des embryons précoces mitotiques (0 à 2 h) et interphasique (2 à 17 h) ont été recueillis pour la préparation d'extraits de mitose et d'interphase. Afin de permettre l'assemblage de microtubules, ces extraits ont ensuite été incubés avec du GTP et du taxol à 25°C. Les microtubules et les MAPs ont été sédimentés par centrifugation à travers un coussin de glycérol et ont été séparés par SDS-PAGE. B) SYPRO SDS-PAGE représentant les profils protéiques d'extrait mitotiques (Mit) et Interphasiques (Int) des culots de microtubules avant la spectrométrie de masse. C) Les protéines identifiées ont été classées en trois catégories sur la base de leurs quantités relatives dans chaque échantillon : générales (protéines associées aux microtubules interphases et mitotiques), mitotiques ou interphasiques. D) Exemples de protéines connues identifiées dans les culots d'échantillons mitotiques et interphasiques. Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre de peptides identifiés dans les culots d'interphase (nombre à gauche) et mitotiques (nombre à droite). E) Classification des processus biologiques identifiés (avec la valeur p corrigée), basée sur les termes d'annotation GO Slim correspondant aux trois classes différentes de protéines identifiées dans cette étude. F) Stratégie de crible des gènes mitotiques dans le SNC de la drosophile. Des drosophiles femelles exprimant Gal80ts (répresseur Gal4) et Gal4 dans le cerveau ont été croisées avec des mâles portant le promoteur UAS et des séquences en aval pour l'expression d'ARNi ciblant les gènes à analyser. À 20°C, Gal80ts inhibe Gal4. Cependant, l'augmentation de la température à 29°C permet l'expression des ARNi. Après 3 jours, les cerveaux ont été fixés et des anomalies mitotiques ont été détectées par immunofluorescence. G) Nbs mitotiques après ARNi dirigés contre plusieurs nouveaux gènes mitotiques déjà connus (klp61F, polo) ou nouvellement identifiés dans cette étude (Tcp-1, CG2943, CG14998/Ensconsin). L'aPKC apparaît en rouge, la tubuline en vert et la phospho-histone H3 (Ser10) en bleu. Barre d'échelle : 10 µm.

## RÉSULTATS



# I. Étude du rôle de dTBCE dans l'assemblage du fuseau mitotique

## I.A Introduction

Les microtubules sont des composants dynamiques essentiels du cytosquelette qui s'assemblent à partir de dimères de tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  (Desai et Mitchison, 1997). Lors de la division cellulaire, les cellules méiotiques et mitotiques forment un fuseau bipolaire à base de microtubules qui permettent la ségrégation des chromosomes entre les deux cellules filles. *In vitro*, la nucléation des microtubules peut se produire spontanément en présence de GTP lorsque la concentration en dimères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$  atteint une concentration dite critique. Dans les organismes vivants, la nucléation des microtubules du fuseau mitotique se produit à différents sites de l'appareil mitotique (au niveau des centrosomes et autour de la chromatine mitotique). La nucléation des microtubules au cours de l'assemblage du fuseau méiotique et mitotique nécessite de nombreux facteurs supplémentaires. Un groupe de protéines clé permettant la nucléation des microtubules est le complexe  $\gamma$ -TuRC qui est recruté aux différents sites de nucléation (Kollman et al., 2011; Roostalu et Surrey, 2017; Goshima et al., 2008; Petry et al., 2013). La nucléation des microtubules requiert également un gradient Ran-GTP autour de la chromatine qui permet la libération locale de facteurs d'assemblages du fuseau mitotique (SAFs) grâce à un système d'importines (Kalab et Heald, 2008). Cependant, la voie Ran n'est pas toujours indispensable pour la nucléation des microtubules dans tous les organismes modèles (Dumont et al., 2007; Cesario et al., 2012). En effet, il semble que le complexe de chromosomes passagers (CPC) contribue également à la nucléation (Moutinho-Pereira et al., 2013; Maresca et al., 2009). Fait intéressant, même si, *in vitro*, la nucléation des microtubules est dépendante de la concentration en tubuline, l'accumulation locale de tubuline n'a que très récemment été considérée comme un élément clé *in vivo* (Woodruff et al., 2017). Cependant, chez *C.elegans* et *D. melanogaster*, une forte accumulation de tubuline libre autour des centrosomes et des chromosomes a été observée au cours de la mitose, même si la pertinence physiologique de cette augmentation locale de la tubuline pour la nucléation des microtubules reste mal comprise (Hayashi et al., 2012; Schweizer et al., 2015; Woodruff et al., 2018; Yao et al., 2012). Nous avons récemment isolé le cofacteur de la tubuline E (dTBCE) comme une protéine essentielle pour l'assemblage du fuseau

mitotique dans les neuroblastes (Nbs) du système nerveux central de *Drosophila melanogaster* (Gallaud et al., 2014). Nous montrons ici que dTBCE est essentielle pour l'accumulation de la tubuline soluble fonctionnelle autour de la chromatine après la rupture de l'enveloppe nucléaire (NEBD). Ce processus semble être un mécanisme général essentiel pour contrôler dans l'espace et le temps la polymérisation des microtubules et l'assemblage du fuseau mitotique.

## I.B Matériels et méthodes

### I.B.1 Constructions ADN

Le cadre de lecture ouvert de dTBCE a été obtenu par PCR en utilisant le clone GM13256 d'ADNc que l'on a eu auprès du Drosophila Genomic Resource Center (DGRC, Université de l'Indiana) et cloné sans le codon Stop dans pENTR (InvitroGen) pour générer le clone d'entrée pENTR-TBCE. Ce clone a ensuite été utilisé pour la mutagenèse à l'aide du kit de mutagenèse dirigée sur site Quick II (Stratagene). Le site NLS putatif GLVMKRFRLS détecté à l'extrémité C-ter du gène *tbce* a été muté en GLVMAAFALS pour générer le pENTR-TBCEmutNLS. La délétion de HsTBCE à proximité du motif conservé du domaine CAP-GLY observée chez les patients présentant un hypoparathyroïdisme, un dysmorphisme facial avec un retard mental a été reproduite en supprimant la séquence d'acides aminés IVDG correspondante de dTBCE afin de générer le pENTR-TBCE<sup>HMF</sup>. Le motif CAP-GLY conservé GLRGKHNG présent dans la région N-ter de la séquence de dTBCE a été mutée en GLRGAANG (Michel Steinmetz, communication personnelle) pour générer le pENTR-TBCE<sup>mutCG</sup>. Pour générer des protéines TBCE sauvages et mutantes fusionnées avec l'étiquette GFP (ou Vénus) en C-ter, les clones d'entrée mutés correspondants ont été recombinaés à l'aide d'un kit de clonase LR (InVitrogen) dans pUWG, pTWG ou pPWG obtenu auprès du DGRC. Les vecteurs de destination ont ensuite été injectés dans des embryons de drosophiles pour la transformation médiée par l'élément P (BestGene).

Le domaine N-ter de dTBCE (acides aminés 1 à 207) a été cloné en utilisant le système In-Fusion (Takara) dans le plasmide pET23B (Clontech) pour générer le vecteur pET-NtTBCE et permettre la production d'anticorps chez le cobaye.

Pour la génération de lignées cellulaires stables exprimant TBCE-GFP (ou Venus) ou TBCE<sup>mutCG</sup>-GFP, les clones d'entrée correspondants ont été recombinaisonnés dans pPURO-GFP, permettant l'expression de protéines de fusion C-ter GFP exprimées sous le contrôle du promoteur actine5C et la sélection de la Puromycine (Roger Karess, Institut Jacques Monod, PARIS).

### I.B.2 Lignées de drosophile utilisées

Les drosophiles ont été maintenues dans des conditions standard à 25°C. Les mutants *tbce*<sup>LH15</sup> et *tbce*<sup>z0241</sup>, décrits précédemment, et correspondent à des allèles nuls où la létalité est embryonnaire (Jin et al., 2009). La combinaison hétéroallélique *tbce*<sup>LH15</sup>/*tbce*<sup>z0241</sup> a été utilisée dans nos expériences de sauvetages pour les différents variants de TBCE étiquetée par GFP (ou Vénus) et nommée dans le manuscrit *tbce*. L'expression de TBCE-GFP sous le contrôle d'un promoteur poly-ubiquitine sauve à la fois la viabilité du mutant *tbce*. Des drosophiles transgéniques présentant les génotypes suivants ont été utilisées pour l'expression des ARNi ou des protéines : TubGAL80ts; 69B-GAL4, TubGAL80ts, 69B-GAL4, Insc-Gal4, UAS-Cherry- $\alpha$ tubuline, actine5C-GAL4, V32C-GAL4 et ont été obtenues chez Bloomington Drosophila Stock Center (Université de l'Indiana). Les drosophiles  $\beta$ -tubuline-GFP ont déjà été utilisées dans certaines études (Inoue et al., 2004). L'expression des transgènes TBCE-GFP, TBCE<sup>mutCG</sup>-GFP, TBCE<sup>mutNLS</sup>-GFP ou TBCE<sup>HRD</sup>-GFP sont inductibles grâce aux promoteurs UAS. Les lignées transgéniques (avec le promoteur UAS) ont été obtenues auprès du Centre Vienna *Drosophila* Center (VDRC) pour dépléter TBCE, Mad2 et RAN. Les drosophiles exprimant EB1-GFP ont été décrites dans notre précédente étude (Gallaud et al., 2014). L'expression de TBCE-GFP, TBCE<sup>mutNLS</sup>-GFP ou TBCE<sup>HRD</sup>-GFP (avec pUAS<sup>t</sup> ou pUAS<sup>p</sup>) exprimé avec l'activateur actine5C-Gal4 ont sauvé la létalité des mutants *tbce*. En revanche, l'expression de TBCE<sup>mutCG</sup>-GFP ne sauve pas la létalité. La lignée Nup-107-RFP nous a été donnée par le docteur Valérie Doye (Katsani et al., 2008). Les lignées Lamine-GFP et CD8-GFP ont été obtenues auprès de Bloomington.

### II.B.3 Expression et purification de la protéine recombinante

Le vecteur d'expression pET-NtTBCE a été transformé dans la souche E. coli BL21 (DE3) (New England Biolabs). L'expression de la protéine recombinante a été induite avec de l'IPTG 1 mM pendant 4 heures à 25°C et le culot bactérien a été stocké à -20°C jusqu'à son utilisation. Le culot a été remis en suspension sur glace dans du tampon de lyse (LB: Tris 10mM, 10% de glycérol, 500mM de NaCl, pH 7,4) contenant 1% de Triton X-100 (Sigma), supplémenté d'inhibiteurs de protéases (Roche) et de lysozyme (1 mg/mL). Le culot bactérien remis en suspension a ensuite été traité aux ultrasons 10 fois pendant 10sec sur glace et centrifugé à 10 000g pendant 30 min à 4 ° C. La protéine marquée à l'hexa-histidine dans le surnageant a été purifiée conformément aux instructions du fabricant sur une colonne de nickel. (Qiagen), dialysé pendant une nuit dans du PBS à 4°C et utilisé pour l'immunisation du cobaye (Covalab).

### II.B.4 Anticorps

L'anticorps polyclonal anti-Ran de lapin (ab11693) provenait de Abcam et a été utilisé au 1:200 pour l'immunomarquage et au 1:2000 pour le Western blot. L'anticorps monoclonal anti-tubuline tyrosiné YL1/2 de rat (1:200) et les anticorps monoclonaux de souris et d'histones anti-phosphorylés polyclonaux de lapin H3 (Ser10) (1:500) ont été obtenus auprès de Millipore. L'anticorps monoclonal de souris anti-GFP (1:1000) a été obtenu auprès de Roche. Les anticorps anti- $\beta$ -tubuline de souris (1:1000) et l'anti-actine de lapin (1:5000) ont été obtenus de Santa Cruz. Les anticorps anti-Skeletor (1:100) de souris, anti-Mégator (1:100), anti-Chromator (1:100), anti-lamine (1:100) ont été achetés auprès de la banque d'hybridomes de Drosophila Studies. L'anticorps monoclonal de souris anti-TBCE (1:500) nous a été gracieusement donné par le Dr Zhang (Jin et al., 2009). L'anticorps anti-TBCE de cobaye est dirigé contre la région située entre les acides aminés 1 et 207 (1:2000). Les anticorps anti-importine alpha 1, 2 et 3 de souris ont été aimablement fournis par Pr M. Siomi (Yashiro et al., 2018). Le polyclonal anti-TBCE-Nt de cobaye a été utilisé au 1:1000 pour l'immunocoloration et au 1:10 000 pour le transfert Western Blot. Les anticorps secondaires de chèvre conjugués à la peroxydase (1:5000) ont été obtenus auprès de Jackson ImmunoResearch

Laboratories, et les anticorps secondaires Alexa Fluor (1:1000) auprès de Life Technologies.

### **II.B.5 Western Blot**

Après le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose (GE Healthcare) en utilisant un système TransBlot Turbo (Biorad), les membranes ont été brièvement colorées avec du ponceau S et bloquées pendant 2h avec du TBST (Tris 20 mM, NaCl 150 mM et 0,1% Tween20, pH 7,4) contenant 10% de lait écrémé (ou 5% de BSA pour l'anticorps anti-RAN). L'incubation primaire a été effectuée pendant une nuit à 4°C dans du TBST contenant 5% de lait écrémé ou 2,5% de BSA (pour l'anticorps anti-Ran). L'incubation avec l'anticorps secondaire a été effectuée dans du lait écrémé à 5% pendant 2h à la température ambiante. Trois lavages (30 min chacun) ont été effectués après chaque incubation d'anticorps dans du TBST.

### **II.B.6 Culture cellulaire S2**

Sauf indication contraire, les réactifs utilisés pour la culture cellulaire proviennent de la société InVitrogen. Les cellules S2 ont été cultivées à 25°C dans du milieu Schneider additionné de 10% de sérum décomplémenté de veau fœtal (FCS), de péniciline (100U/ml) et de streptomycine (100 U/ml). La transfection plasmidique a été réalisée à l'aide de Fugene HD (Qiagen) et des lignées cellulaires stables exprimant la GFP, la TBCE-GFP et la TBCE<sup>mutCG</sup>-GFP ont été sélectionnées avec de la puromycine à 8 µg/ml (technologies Life).

### **II.B.7 Analyse d'immunofluorescence**

Les cellules S2 ont été déposées sur des lamelles couvertes de concanavaline A et incubées pendant 1h à 25°C. Les cellules sont fixées pendant 10min avec du fixateur de Bouin puis 5min dans du méthanol à -20°C (Qi et al., 2004). D'autres cellules S2 ont été fixées pendant 10min dans un tampon (NaCl 137mM, KCl 5mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,1mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, PIPES 5mM, glucose 5,5mM, pH 6,9), complété par 7% de formaldéhyde (réf. F-1635, Sigma). Les cellules fixées ont été traitées pour les analyses d'immunofluorescence comme décrit précédemment (Romé et al., 2010). Les embryons,

recueillis sur des plaques d'agar additionnées de jus de raisin et de levure, ont été lavés dans du TBS contenant 0,1% de triton et déchorionés dans de l'eau de Javel diluée à 50%. Les embryons ont été fixés dans un mélange contenant 50% de fixateur de Bouin et 50% d'heptane pendant 20min à température ambiante, puis transférés dans du méthanol à -20°C et traités pour l'immunofluorescence comme décrit précédemment (Walker et al., 2000). L'immunomarquage des Nbs, ainsi que le test au froid ont été réalisés comme décrit précédemment (Gallaud et al., 2014). Les cerveaux, les embryons ou les cellules S2 ont été montés dans le milieu de montage ProLong Gold (Life Technologies) et les images ont été acquises sous un microscope confocal SP5 vertical (Leica) équipé d'un objectif 63X1,3NA. Pour les tests de polymérisation, les cerveaux ont été incubés avant la fixation pendant 30min dans du milieu de drosophile Schneider contenant 10% de FCS supplémenté avec du Taxol (Sigma) à une concentration finale de 20µM.

#### II.B.8 Microscopie en temps réelle

Des embryons pondus entre 0 à 2h exprimant des protéines fluorescentes ont été immobilisés sur du scotch double face et déchorionés doucement à la main avec une pince. Ces embryons ont été déposés dans une goutte d'huile Voltalef sur une lame de verre séparée par deux lamelles de 22x22 mm qui servent de cale. Les embryons ont ensuite été recouverts d'une lamelle de 40x22 mm avant leur imagerie immédiate.

Les cerveaux exprimant les différentes protéines marquées ont été disséqués dans le milieu de drosophile Schneider contenant 10% de FCS. Pour les expériences de dépolymérisation de microtubules, le milieu a été supplémenté en colchicine (Sigma) à une concentration finale de 20µM. Les préparations ont été scellées avec de l'huile minérale (Sigma). Les images ont été acquises avec un Spinning Disc monté sur un microscope inversé (Elipse Ti :Nikon) équipé d'un objectif 60X 1,4 NA à 25°C. Les séries en Z ont été acquises toutes les 20, 30 ou 60sec avec une caméra CCD (CoolSnap HQ2; Photometrics) et un sCMOS ORCA Flash 4.0 (Hamamatsu) contrôlée par le logiciel d'acquisition MetaMorph. Les images ont été traitées avec le logiciel ImageJ et sont présentées sous forme de projections à intensité maximale.

## II.B.9 Immunoprécipitation

Les cellules S2 stables exprimant GFP, TBCE-GFP et TBCE<sup>mutCG</sup>-GFP ont été cultivées et collectées par centrifugation. Les cellules ont été remises en suspension dans du PBS, centrifugées et les culots cellulaires ont été congelés rapidement dans de l'azote liquide et stockés à -80°C ou utilisés immédiatement pour les immunoprécipitations. Les culots cellulaires ou les embryons sont repris dans 200µl de tampon de lyse (10mM Tris/Cl; 150mM NaCl; 0,5mM EDTA) à 4°C supplémenté d'inhibiteur de protéases (Roche) et de phosphatases (Roche). Le culot remis en suspension est traité aux ultrasons 10 fois pendant 10 sec sur de la glace et centrifugé à 20 000g pendant 30min à 4°C. Le lysat est transféré dans un nouveau tube et 300µl sont ajouté. En parallèle 10µl de billes GFP-Trap (Chromotek) sont lavées dans 500µl de tampon à 4°C de lyse. Les billes sont récupérées sur un support magnétique. Le Surnagent est éliminé et l'opération est répétée trois fois. Le lysat cellulaire est ajouté aux billes et incubé 1h à 4°C sur roue. Le surnagent est ensuite éliminé et les billes lavées dans du tampon trois fois pendant 5min.

Pour l'expérience d'affinité avec la tubuline soluble, les immunoprécipitations ont été répétées dans les mêmes conditions avec des extraits d'embryons. Les billes ont ensuite été incubées avec de la tubuline pure (contenant 20% de tubuline rhodamine provenant de Cytoskeleton, Inc) à une concentration finale de 20µM pendant 5min à 37°C. Les billes sont ensuite déposées entre deux lamelles de 18x18mm et de 22x22mm précédemment traitées avec du polyéthylène glycol comme décrit précédemment (Field and Mitchison, 2018). Les billes sont ensuite observées pour analyses au microscope.

## II.B.10 Spectrométrie de masse

### *a) Digestion des protéines sur billes*

Les billes ont été remises en suspension dans un tampon de digestion contenant 75mM de bicarbonate d'ammonium, pH 8,0, réduites à l'aide de DTT 10 mM pendant 20 min, puis alkylées à température ambiante pendant 20min à l'obscurité avec du chloroacétamide 40mM. Les protéines liées aux billes ont été digérées avec 1µg de

mélange trypsine/Lys-C (Promega) pendant 3 h à 37°C, puis 150ng de trypsine/Lys-C est ajouté pour digestion. Les peptides ont été isolés sur des pointes C18 conformément aux instructions du fabricant (Thermo Fisher Scientific) et séchés jusqu'à leurs achèvements dans un concentrateur SpeedVac équipé d'un piège de condensation intégré à -100°C.

### *b) Analyse LC-MS/MS*

Les échantillons de peptides ont été analysés par nano LC-MS/MS avec un système de chromatographie Dionex UltiMate 3000 nanoRSLC (Thermo Fisher Scientific / Dionex Softron GmbH, Germering, Allemagne) connecté à un spectromètre de masse Orbitrap Fusion™ Tribrid™ (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) équipé d'une source d'ions nanoélectrospray. Les peptides ont été piégés à 20µl/min dans le solvant de charge (2% acétonitrile, 0,05% TFA) sur une pré-colonne de cartouche p18 C18 de 5 mmx300µm (Thermo Fisher Scientific / Dionex Softron GmbH, Germering, Allemagne) pendant 5min. Ensuite, la pré-colonne a été mise en ligne avec la colonne Pepmap Acclaim (ThermoFisher), une colonne de séparation de diamètre interne de 50cm x75 µm et les peptides ont été élués avec un gradient linéaire de 5-40% de solvant B (A: 0,1% d'acide formique). B: 80% acétonitrile, 0,1% acide formique) en 30min à 300 nL/min. Les spectres de masse ont été acquis en utilisant un mode d'acquisition dépendant des données en utilisant le logiciel Thermo XCalibur version 4.1.50. Des spectres de masse à balayage complet (350 à 1800m/z) ont été acquis dans l'Orbitrap en utilisant une cible AGC de 4e5, un temps d'injection maximal de 50ms et une résolution de 120 000. L'étalonnage interne a été effectué à l'aide de la masse de verrouillage sur le siloxane m/z ion. Chaque balayage MS a été suivi de l'acquisition des spectres MS/MS de fragmentation des ions les plus intenses pendant une durée de cycle totale de 3 secondes (mode vitesse maximale). Les ions sélectionnés ont été isolés à l'aide de l'analyseur quadripolaire dans une fenêtre de 1,6m/z et fragmentés par dissociation induite par collision à haute énergie (HCD) avec 35% d'énergie de collision. Les fragments résultants ont été détectés par le piège à ions linéaire en vitesse de balayage rapide avec une cible AGC de 1e4 et un temps d'injection maximal de 50ms. L'exclusion dynamique de peptides précédemment fragmentés a été définie pour une période de 20sec et une tolérance de 10ppm.

### *c) Recherche dans la base de données*

Les données de spectrométrie de masses générées par l'instrument Orbitrap™ Fusion™ Tribrid™ (fichiers \* .raw) ont été analysées par MaxQuant (Tyanova et al., 2016) (version 1.5.2.8) en utilisant les paramètres par défaut et la quantification sans étiquette (LFQ). Andromeda (Cox et al., 2011) a été utilisé pour rechercher les données MS / MS par rapport à un protéome de référence au format FASTA *Drosophila melanogaster* téléchargé à partir d'Uniprot (2019) (21 923 entrées) et complété par une liste de contaminants communs (245 entrées) maintenu par MaxQuant et concaténé avec la version inversée de toutes les séquences (mode leurre). La longueur minimale du peptide a été fixée à 7 acides aminés et la trypsine a été spécifiée comme protéase permettant jusqu'à deux clivages manqués. La carbamidométhylation des cystéines [+57,02146 Da] a été définie comme une modification fixe, tandis que les additions en masse suivantes ont été utilisées comme modifications variables : oxydation de la méthionine [+15,99491 Da], désamidation de l'asparagine et de la glutamine [+0,98401 Da], N-ter et de la lysine acétylation [+42,01056 Da] et pyro-glu à partir d'acide glutamique [-18,01055 Da] et de glutamine [-17,02654 Da]. Les résultats négatifs (leurres) et les contaminations communes ont été supprimés.

### *d) Annotation fonctionnelle*

La base de données pour l'annotation, la visualisation et la découverte intégrée (DAVID) (Huang da et al., 2009a; Huang da et al., 2009b) a été utilisée pour l'annotation de protéines. L'outil d'annotation fonctionnelle a été utilisé pour effectuer la classification GO (ontologie) des gènes correspondants à l'aide des paramètres par défaut (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). Les protéines de TBCE dont l'interaction est perdue lors avec les substitutions dans le domaine CAP-GLY ont été sélectionnées pour l'analyse par GO. Les trois termes de catégories GO les plus significatifs pour chaque sous-ontologie (basés sur les valeurs p des termes GO) ont été sélectionnés.

### **e) Modélisation du réseau de protéines**

Le réseau d'interactions protéine-protéine (IPP) de TBCE a été construit à l'aide de la base de données STRING (<https://string-db.org/>) (Jensen et al., 2009). Un groupe de protéines portant les affectations GO avec les termes suivants ont été sélectionné pour générer un sous-réseau spécifique de protéines interagissant avec TBCE : Processus biologique : importation de protéines dans le noyau ; Composant cellulaire : pore nucléaire ; Fonction moléculaire : constituant structurel du pore nucléaire.

## **I.C Résultats**

### **I.C.1 La protéine dTBCE est nécessaire pour l'assemblage du fuseau mitotique.**

Pour étudier le phénotype de perte de fonction de dTBCE, nous avons utilisé des traitements de deux jours avec des ARNi spécifiques de dTBCE dans le SNC (Système nerveux central) de la drosophile (voir méthodes). L'efficacité des lignées transgéniques exprimant deux différents ARNi a été testée par Western blot. Nous avons observé que ces lignées diminuent les niveaux de protéines de dTBCE endogène (Figure 1A). Les cerveaux déplétés pour dTBCE étaient environ 2 fois plus petits que les contrôles, indiquant un retard de développement sévère du tissu neural (Figure 1B, n>50). Dans nos premières analyses tissulaires, les mitoses dans les cerveaux déplétés pour dTBCE présentent de nombreux chromosomes surcondensés suggérant un retard mitotique (Figure 1C). En accord avec ces observations, les analyses d'index mitotiques révèlent que l'inactivation de dTBCE augmente significativement le nombre de cellules en mitoses (Figure 1D). Les immunofluorescences des cellules souches du SNC, les Nbs, montrent que les cellules en métaphases dans les cerveaux déplétés pour dTBCE ont une densité de microtubules plus faible, ainsi qu'une diminution significative de la longueur des fuseaux mitotiques (Figure 1E-F), pouvant potentiellement engendrer des erreurs d'assemblage du fuseau mitotique et donc des délais de mitose. Afin de valider cette hypothèse, nous avons filmé des Nbs exprimant la tubuline-GFP (Figure 1G). La déplétion de dTBCE entraîne une augmentation significative du temps de mitose (Figure 1H). Ce retard mitotique associé aux anomalies morphologiques d'assemblage du fuseau

mitotique est souvent le signe de l'activation prolongée du point de contrôle de l'assemblage du fuseau (SAC).

Dans le but de confirmer si les délais de mitoses observés sont effectivement induits par le SAC, nous avons inactivé celui-ci en déplaçant un de ses composants essentiels, Mad2. Nous avons d'abord analysé les indices mitotiques des neuroblastes mitotiques déplétés pour Mad2, dTBCE et la double déplétion dTBCE et Mad2. Nous avons constaté que la double déplétion dTBCE et Mad2 mène à la disparition de cellules mitotiques aux chromosomes surcondensés précédemment observés avec la déplétion de dTBCE seul (Figure S1A) ainsi que l'apparition de cellules aneuploïdes (Figure S1A), suggérant une diminution du nombre de cellules mitotiques. En effet, l'indice mitotique est significativement réduit lorsque dTBCE et Mad2 sont toutes les deux déplétées par rapport à dTBCE ARNi seul (Figure S1B). Nous avons également analysé le temps de mitose des neuroblastes traités avec le ARNi contre dTBCE en présence et en absence de Mad2. Nous avons constaté que la déplétion de dTBCE et de Mad2 entraîne une diminution du délai mitotique comparé au traitement ARNi dTBCE seul (Figure S1C-D). De plus, dans les préparations fixées, nous avons fréquemment détecté des erreurs de ségrégation des chromosomes dans les cellules en anaphase lorsque Mad2 et dTBCE étaient tous deux déplétés, indiquant qu'une activation prolongée du SAC est indispensable afin de ségréger correctement les chromosomes en absence de dTBCE (Figure S1E). Ces observations permettent de conclure que dTBCE est un gène essentiel à l'assemblage du fuseau mitotique. En revanche nous n'avons observé aucun phénotype notable lorsque dTBCE est surexprimé (Figure S2).

### **I.C.2 La protéine dTBCE est nécessaire pour la polymérisation des microtubules autour de la chromatine**

Pour étudier en détail la diminution de la densité de microtubules observée dans la région du fuseau dans les cellules déplétée pour dTBCE, nous avons d'abord analysé la capacité de renucléation des microtubules après dépolymérisation au froid. Les cerveaux sont incubés dans la glace pendant 30min afin de dépolymériser totalement les microtubules puis ils sont fixés à différents temps après un retour à 25°C afin de permettre aux microtubules de nucléer à nouveau (comme décrit précédemment

Gallaud et al., 2014) (Figure 2A). Dans les cellules contrôles, après 30sec à 25°C une forte nucléation de microtubules autour des centrosomes et des chromosomes est observée (n=8). Après 90sec, les fuseaux mitotiques ont une structure bipolaire normale (Figure 2B, à gauche n=6). En revanche, dans les cellules exprimant des ARNi dTBCE, nous constatons que, bien que la nucléation soit forte au niveau des centrosomes, les microtubules semblent incapables de nucléer autour des chromosomes après une incubation de 30sec à 25°C (n=7). Lorsque l'on incube les cerveaux exprimant les ARNi dirigés contre dTBCE à 25°C pendant 90sec, même si les centrosomes semblent conserver leurs potentiels de nucléation, les fuseaux mitotiques des Nbs ont toujours cette faible densité de microtubules autour des chromosomes, (Figure 2B, à droite n=9).

Nous avons décidé de confirmer ces observations en suivant la protéine EB1 étiquetée avec la GFP. Cette protéine s'associe à l'extrémité (+) des microtubules, ce qui nous a permis d'observer dans le temps et l'espace la polymérisation des microtubules de cellules métaphasiques. La vitesse de polymérisation des microtubules ne semble pas avoir été affectée par la déplétion de dTBCE par rapport aux cellules contrôles. Dans les contrôles, les projections maximales révèlent que les microtubules polymérisent principalement au niveau de deux sites principaux de la cellule. Une forte polymérisation est ainsi détectée au niveau des centrosomes ainsi qu'autour des chromosomes (Figure 2C, à gauche). Dans les cellules déplétées pour dTBCE, la polymérisation des microtubules semblait normale dans la région du centrosome, mais elle était clairement affectée dans la région du fuseau, suggérant une nucléation défectueuse des microtubules autour de la chromatine (Figure 2C, à droite). La quantification du ratio de fluorescence EB1-GFP des microtubules entre les centrosomes et la région des chromosomes a révélé une diminution de 50% entre les cellules contrôles et les cellules déplétées pour dTBCE (Figure 2D). Cette diminution de la polymérisation des chromosomes n'est pas due à une diminution de la protéine EB1-GFP car les niveaux exprimés ne sont pas affectés par l'utilisation des ARNi dirigés contre dTBCE (Figure 2E).

La déplétion de dTBCE n'entraînant pas la dégradation des niveaux de tubulines endogènes (Figure 1A), nous avons vérifié que la tubuline était fonctionnelle et donc capable de polymériser en microtubules. Nous avons incubé les cerveaux avec du taxol,

un agent qui empêche la déstabilisation des microtubules. Après 1h d'incubation, nous avons fixé les cerveaux et observé que la quantité de microtubules polymérisés dans les Nbs déplétés pour dTBCE est bien inférieure aux Nbs contrôles (Figure 1F-G). Ceci suggère que sans dTBCE une fraction des hétérodimères ne peut plus être correctement incorporés dans le microtubule.

### **I.C.3 La protéine dTBCE endogène est localisée dans la région du fuseau mitotique pendant la mitose.**

Nous avons précédemment isolé dTBCE à partir de culots de microtubules stabilisés au taxol obtenus à partir d'échantillons d'embryons mitotiques, ce qui suggère que cette protéine présente une affinité directe ou indirecte pour les microtubules (Gallaud et al., 2014; Hughes et al., 2008). Pour étudier la localisation de dTBCE, nous avons produit un anticorps polyclonal spécifiquement dirigé contre le domaine N-ter de dTBCE, capable de reconnaître spécifiquement notre protéine de 60KDa par Western blot avec des échantillons issus d'embryons contrôles (Figure 3A). Grâce à cet anticorps nous avons analysé la localisation de dTBCE endogène pendant la division cellulaire dans des embryons syncytiaux de drosophiles (Figure 3B). Nous avons constaté que dTBCE est localisée dans le cytoplasme et également dans le noyau pendant l'interphase. A partir de la rupture de l'enveloppe nucléaire (NEBD), dTBCE s'accumule dans la région du fuseau jusqu'à être principalement localisée dans cette région à la métaphase. Cette localisation de dTBCE en métaphase dans la région du fuseau, est apparue similaire à des localisations subcellulaires précédemment observées pour d'autres protéines. Elles ont été nommées Skeletor, Mégator et Chromator qui s'assemblent dans la « spindle matrix » au cours de la mitose chez la drosophile (Qi et al., 2004; Rath et al., 2004; Walker et al., 2000). Lors de la métaphase, nous avons constaté que dTBCE colocalise avec certaines de ces protéines de la matrice telles que Skeletor et Chromator (Figure S3). De façon intéressante, la localisation de dTBCE sur la matrice du fuseau semble être limité par la présence de l'enveloppe nucléaire (Figure 1C).

Pour confirmer la localisation de dTBCE obtenue par immunofluorescence, nous avons généré des mouches transgéniques exprimant une protéine dTBCE étiquetée avec la GFP et exprimée cette protéine de fusion sous le contrôle d'un promoteur poly-

ubiquitine (Figure 4 et vidéo 1). Ce transgène est fonctionnel car il est capable de sauver la létalité des mouches mutantes (voir méthodes). Dans les embryons syncytiaux, dTBCE-GFP apparaît cytoplasmique et nucléaire, mais est aussi visible sur la membrane nucléaire et sur les centrosomes (Figure 4A, -01:00, et 4B en haut). Lorsque la cellule entre en mitose, immédiatement après la NEBD (Figure 4A, 00 :00 et Figure 4B à gauche), dTBCE-GFP commence à envahir l'espace nucléaire. Le signal dTBCE-GFP le plus élevé a été observé autour des chromosomes durant la prométaphase. Pendant la métaphase, dTBCE-GFP localise au niveau du fuseau mitotique (Figure 4A, 3:00 et Figure 4B en bas) jusqu'à la télophase avant de réapparaître sur l'enveloppe nucléaire durant la cytokinèse.

#### I.C.4 La localisation de dTBCE et la viabilité des drosophiles est dépendante de la présence du motif conservé présent dans le domaine CAP-Gly.

TBCE possède un domaine CAP-Gly en N-ter très conservé, avec un motif GKHNG. Ce motif est potentiellement responsable des interactions avec d'autres protéines et notamment de la liaison avec la queue C-ter de l' $\alpha$ -tubuline (Steinmetz and Akhmanova, 2008). Il est intéressant de noter qu'une délétion des 4 acides aminés en aval de ce motif conservé dans le domaine CAP-Gly est retrouvée chez des patients humains souffrant d'hypoparathyroïdie, de dysmorphie faciale et de retard mental (HMF) (Parvari et al., 2002). De plus, dTBCE possède un signal de localisation nucléaire putatif (NLS). Nous avons donc généré plusieurs mutants de dTBCE pour observer la contribution de ces deux séquences dans la fonctionnalité de la protéine. Deux mutants du domaine CAP-Gly ont été créés. Nous avons d'abord muté les deux résidus les plus conservés du motif CAP-Gly afin de perturber sa fonctionnalité (TBCE<sup>mutCG</sup>). Ensuite, nous avons supprimé les 4 acides aminés en aval du motif conservé pour reproduire la délétion observée chez les patients HMF (TBCE<sup>delHMF</sup>-GFP). Enfin, nous avons muté le NLS putatif (TBCE<sup>mutNLS</sup>) (Récapitulatif des constructions S4A). Les analyses par Western blot révèlent que toutes les protéines étiquetées par la GFP étaient correctement exprimées à des niveaux sensiblement similaires (Figure S4B). Nous avons ensuite analysé la capacité des TBCE<sup>mutCG</sup>-GFP, TBCE<sup>del</sup>-GFP et TBCE<sup>mutNLS</sup>-GFP à sauver la viabilité des mutants *tbce* (voir méthodes). Nous avons constaté que les deux lignées transgéniques indépendantes exprimant TBCE<sup>mutCG</sup>-GFP ne sont pas en mesure de sauver la létalité. En revanche,

TBCE<sup>delHMF</sup>-GFP et TBCE<sup>mutNLS</sup>-GFP sont en mesure de sauver la létalité des drosophiles *tbce*. Cela suggère que le motif CAP-Gly de dTBCE est essentiel à la viabilité des drosophiles, mais que la délétion observée chez les patients HMF ainsi que l'abrogation du NLS putatif n'altèrent pas de manière significative le développement des drosophiles. Nous avons également observé la localisation de TBCE-GFP, TBCE<sup>mutCG</sup>-GFP, TBCE<sup>delHMF</sup>-GFP et TBCE<sup>mutNLS</sup>-GFP dans des embryons. Nous n'avons observé aucune différence avec nos précédentes observations de localisation avec les transgènes TBCE<sup>delHMF</sup>-GFP et TBCE<sup>mutNLS</sup>-GFP. Cependant, la lignée transgénique exprimant la protéine TBCE<sup>mutCG</sup>-GFP, est principalement cytoplasmique, elle n'est pas retrouvée sur l'enveloppe nucléaire pendant l'interphase ni au niveau des centrosomes. De plus, TBCE<sup>mutCG</sup>-GFP n'est pas capable de s'accumuler dans l'espace nucléaire et d'interagir avec le fuseau mitotique comme observé avec les autres lignées transgéniques dTBCE exprimées dans les mêmes conditions (Figure 4D). Ces données suggèrent que le domaine CAP-Gly via son motif conservé GKHNG joue un rôle clé pour la fonctionnalité de dTBCE.

### I.C.5 La protéine dTBCE s'associe aux protéines de pores nucléaires et aux composants de la voie Ran.

Pour approfondir la compréhension de la fonction moléculaire de dTBCE, nous avons réalisé des immunoprécipitations avec les lignées transgéniques de cellules S2 exprimant la GFP, TBCE-GFP et TBCE<sup>mutCG</sup>-GFP (voir méthodes). Les immunoprécipités ont été soumis à des analyses de spectrométrie de masse pour identifier les protéines interagissant avec dTBCE (voir méthodes) (Figure 5 A-B). C'est avec surprise que nos différentes analyses protéomiques ne nous ont pas permis de détecter les partenaires connus de TBCE précédemment décrits dans la littérature, tel que les autres chaperonnes de la tubuline (TBC A-D). En revanche, ces analyses nous ont permis d'identifier de nouveaux partenaires en adéquation avec nos analyses de localisation. Tout d'abord, les protéines du pore nucléaire (Nups) sont les protéines les plus abondantes retrouvées sur les billes TBCE-GFP. De façon intéressante, ces interactions sont absentes des billes TBCE<sup>mutCG</sup>-GFP. En observant la localisation de la nucléoporeine Nup-107 dans les embryons syncytiaux, nous avons constaté que cette nucléoporeine et dTBCE ont des localisations très similaires. Nup107 et dTBCE se colocalisent au niveau de l'enveloppe

nucléaire en interphase, elles s'accumulent en même temps dans la région du fuseau et colocalisent dans cette région pendant la division cellulaire (Figure S5).

dTBCE présente également une forte association dépendant du motif conservé du CAP-Gly avec les protéines Ran et les importines ( $\alpha$  et  $\beta$ ), ce qui suggère un rôle du gradient Ran en amont ou en aval de dTBCE. Nous avons répété ces expériences d'immunoprécipitations et confirmé par Western blot que dTBCE-GFP interagit effectivement avec Ran et l'importine- $\alpha$ 2 (Figure 5C).

### I.C.6 dTBCE est essentielle pour l'accumulation de tubuline fonctionnelle dans la région du fuseau mitotique

Au vu de ces résultats, nous avons décidé d'étudier un mécanisme encore mal compris, l'accumulation de tubuline soluble dans la région du fuseau. Cette accumulation de tubuline est observée dans les mitoses semi-ouvertes de *D. melanogaster* et *C. elegans* (Yao et al., 2012 ; Hayashi et al; 2012). De plus, chez *C. elegans*, il a été décrit que Ran est nécessaire pour cette accumulation (Hayashi et al., 2102). Nous avons émis l'hypothèse que dTBCE via son affinité avec les protéines du gradient Ran et la tubuline soluble, pouvait jouer un rôle clé dans ce processus. Dans le but de confirmer que dTBCE est capable d'accumuler de la tubuline soluble dans la région du fuseau *in vitro*, nous avons immunoprécipité des extraits embryonnaires exprimant la GFP, TBCE-GFP et TBCE<sup>mutCG</sup>-GFP avec des billes anti-GFP. Les billes sont ensuite incubées avec de la tubuline pure (additionnée de 20% de tubuline rhodamine) (Figure 6A). Après une incubation de 5min à 37°C, les billes sont observées sous un microscope à fluorescence. Nous pouvons observer que les billes TBCE-GFP sont capables d'accumuler la tubuline soluble mais pas les billes couplées à la GFP seule. Nous avons confirmé que l'interaction entre dTBCE et la tubuline soluble interagissent via le motif CAP-Gly car une diminution significative de l'accumulation de tubuline soluble est observée avec les billes TBCE<sup>mutCG</sup>-GFP (Figure 6B). Ces résultats confirment que dTBCE possède la propriété d'interagir avec la tubuline soluble via son domaine CAP-Gly.

Afin de visualiser l'accumulation de la tubuline soluble dans la région du fuseau mitotique, nous avons filmé des Nbs exprimant cherry- $\alpha$ -tubuline après un traitement

avec de la colchicine afin empêcher la polymérisation des microtubules. Avec ce traitement, on peut observer que la tubuline soluble s'accumule dans la région du fuseau à la NEBD indépendamment de la présence des microtubules pré-existants (Figure 6C) et confirmer les observations faites chez *C. elegans* (Hayashi et al., 2012). L'enrichissement maximal dans la région du fuseau est observé une minute après la NEBD. Dans un premier temps nous avons confirmé que Ran est impliqué dans ce mécanisme chez la *D.melanogaster* (Figure S6A). Nous avons utilisé des ARNi dirigé contre Ran afin d'inactiver la protéine et obtenu de nombreux phénotypes comme précédemment observé (Figure S6B-C). De plus, nous avons observé que la tubuline soluble n'est plus capable de s'accumuler correctement dans la région du fuseau mitotique lorsque Ran est déplété (Figure S6B-C) (Silverman-Gavrila et al., 2006). Nous avons réitéré cette expérience avec les Nbs exprimant des ARNi dTBCE et observé un résultat sensiblement similaire (Figure 6C-D). La perte de fonction de TBCE ou Ran entraîne un délai et une diminution de l'enrichissement de tubuline, ce qui suggère que ces deux protéines sont nécessaires pour l'accumulation de tubuline soluble dans la région du fuseau après la NEBD.

Afin de déterminer si dTBCE et l' $\alpha$ -tubuline sont accumulés en même temps dans l'espace nucléaire, nous avons filmé des Nbs exprimant TBCE-Vénus et cherry- $\alpha$ -tubuline. Nous avons pu observer que TBCE-Vénus est enrichie quelques instant avant la tubuline (Figure S7). Cette observation nous indique que les protéines sont recrutées séquentiellement au sein de la matrice du fuseau. Nos résultats permettent de conclure que l'enrichissement de la tubuline est un processus en plusieurs étapes ou dTBCE est recruté en amont.

## I.D Discussion

### I.D.1 Rôle de TBCE dans la formation de l'hétérodimère de tubuline

Les TBCs contrôlent la concentration de dimères disponibles afin de réguler la polymérisation des microtubules (Lopez-Fanarraga et al., 2001; Al-bassam, 2017). Plus particulièrement, la protéine TBCE jouerait un rôle essentiel dans le repliement de l' $\alpha$ -tubuline mais aussi dans la formation de l'hétérodimère d' $\alpha\beta$ -tubuline. Pour ces deux dernières fonctions, il a récemment été montré que TBCE agit en formant un complexe transitoire avec TBCD, Arl2 (TBC-DEG) et le dimère  $\alpha\beta$ -tubuline (Nithianantham et al., 2015; Chen et al., 2016). Cependant, le mécanisme exact reste encore mal connu et ce pour plusieurs raisons.

Tout d'abord, une précédente expérience de spectrométrie de masse n'a pas permis d'identifier d'TBCE comme un partenaire interagissant fortement avec Arl2 chez la drosophile (Chen et al., 2016). Nous confirmons cette observation avec nos analyses protéomiques qui n'ont détecté aucun des membres de ce complexe TBC-DEG en association avec d'TBCE. Ces observations sont à interpréter avec précautions car bien que non détectés dans leurs analyses de spectrométrie de masse, Chen et ses collègues sont capables de détecter (en cas d'expression forcée *in cellulo*) l'interaction d'Arl2 avec les différents TBCs (TBCC, TBCD, TBCE) (Chen et al., 2016). Par conséquent, de nouvelles études biochimiques seront essentielles pour caractériser les différents complexes et les affinités entre les différentes chaperonnes et la tubuline dans un contexte physiologique. De plus, il serait intéressant de connaître la stabilité de ces différents complexes ainsi que la durée de demi-vie de l' $\alpha$ -tubuline et la  $\beta$ -tubuline monomérique *in vivo*.

Il a été montré que dans les cellules humaines, la surexpression de TBCE mène à une diminution des hétérodimères de tubulines, ce qui mène à la destruction du réseau de microtubule en interphase (Tian et al., 2013). En revanche, chez la drosophile la surexpression n'a aucun effet sur la stabilité des microtubules (Cette étude, Jin et al., 2009). Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que les protéines TBCE de drosophile ou humaine ont des fonctions divergentes selon les espèces. De futures expériences seront donc nécessaires afin de réconcilier les différences observées entre les modèles quant à la surexpression de TBCE. Cependant jusqu'à maintenant, la perturbation

génétique de TBCE par mutation ou ARNi induisent les mêmes effets chez toutes les espèces (de la levure à l'homme), des défauts de polymérisation des microtubules. Ce qui laisse tout de même penser que la fonction de TBCE a été bien conservée tout au long de l'évolution (Parvari et al., 2002; Tian and Cowan, 2013; Jin et al., 2009).

*In vivo*, les hétérodimères solubles  $\alpha\beta$ -tubulines sont sujets aux dommages et au vieillissement, ce qui peut altérer la polymérisation des microtubules (Aumeier et al., 2016). Par conséquent, les chaperonnes pourraient permettre l'accumulation de tubuline fonctionnelle mais pourrait aussi participer à la dégradation ou au recyclage de ces hétérodimères d' $\alpha\beta$ -tubulines altérés. Par ailleurs, la dynamique des microtubules en interphase ou en mitose est différente. En interphase, les microtubules ont une durée de demi vie est d'environ 15min, alors qu'en mitose, elle diminue aux alentours de 30-90sec (Desai and Mitchison, 1997). Cette instabilité des microtubules est principalement due à une augmentation des fréquences de catastrophes. Ceci permettrait d'expliquer l'importance en particulier pendant la mitose de recycler ou dégrader les dimères de tubulines au niveau des sites de nucléations. Par conséquent, TBCE pourrait directement participer à l'homéostasie des dimères de tubulines afin de contrôler dans l'espace et le temps la dynamique des microtubules *in vivo*.

### I.D.2 Régulation spatiotemporelle de dTBCE

Nos analyses protéomiques montrent que dTBCE interagit avec de nombreuses protéines du pore nucléaire ainsi qu'avec des protéines impliquées dans la voie de nucléation dépendante de Ran. Grâce à notre anticorps polyclonal dirigé contre dTBCE et différentes lignées transgéniques étiquetées avec la GFP, nous avons pu pour la première fois observer avec précision les localisations subcellulaires de dTBCE pendant la division cellulaire. dTBCE localise sur l'enveloppe nucléaire en prophase et s'accumule dans la région du fuseau mitotique à partir de la NEBD. Le motif conservé du domaine CAP-Gly est essentiel afin de médier l'interaction de dTBCE avec les Nups, ce qui permet la localisation de dTBCE sur l'enveloppe nucléaire. Un autre groupe de protéine qui interagit avec dTBCE sont les protéines de la voie Ran : imp- $\alpha$ , imp- $\beta$  et Ran. Ce groupe de protéines est responsable de la régulation spatiotemporelle de facteurs mitotiques autour de la chromatine qui possèdent des séquences NLS. Bien que dTBCE possède un NLS putatif, la mutation de cette séquence n'affecte pas la localisation de dTBCE.

Cependant, certaines Nups possèdent des séquences NLS et participent à l'assemblage du fuseau mitotique en interagissant avec des MAPs (Itoh et al., 2013, orjalo et al., 2006; Mihra et al., 2010; Cross and Powers 2011; Chatel and Fahrenkrog, 2011). Par conséquent, il est tentant de spéculer que Ran-GTP permet l'accumulation de dTBCE via les Nups dans la région du fuseau après la NEBD. En effet, Ran régule l'assemblage de la « spindle matrix » dans l'embryon de drosophile (Silverman-Gavrila et al., 2006).

### I.D.3 La protéine dTBCE est essentielle pour nucléer les microtubules autour de la chromatine

Dans cette étude, nous avons montré que la protéine dTBCE est essentielle pour l'assemblage du fuseau mitotique en nucléant des microtubules autour de la chromatine. Dans la majorité des organismes étudiés, la nucléation des microtubules est dépendante du recrutement de la  $\gamma$ -TuRC. Cependant, des travaux chez *C. elegans*, *Drosophila melanogaster* et chez certaines cellules végétales ont montré que la  $\gamma$ -TuRC n'est pas indispensable pour la nucléation des microtubules. Ces observations suggèrent que d'autres voies peuvent compléter la perte de la  $\gamma$ -TuRC afin d'assembler le fuseau mitotique (Sampaio et al., 2001; Strome et al., 2001; Hannak et al., 2002; Nakaoka et al., 2015). *In vitro*, l'initiation de la nucléation des microtubules est non linéaire et requiert un seuil de concentration en dimère de tubuline appelé la concentration critique afin d'assembler ce que l'on appelle le « noyau critique » (Roostalu and Surrey, 2017). Dans certains organismes modèles, l'accumulation locale de tubuline permettrait l'initiation de la nucléation en absence de  $\gamma$ -TuRC (Woodruff et al., 2017). Cette accumulation serait due au recrutement de protéines liant la tubuline (TPX2 et XMAP215) qui permettraient de concentrer la tubuline soluble et initier la nucléation de microtubules. Toujours chez *C.elegans*, la tubuline soluble est également accumulée dans la région du fuseau à la NEBD et ce processus est dépendant du gradient Ran (Hayashi et al., 2012). Ce mécanisme semble conservé dans d'autres modèles aux mitoses dites semi-ouvertes tel que la drosophile (Yao et al., 2012). Dans des conditions normales, ce processus est difficile à observer à cause de la présence de nombreux microtubules. Cependant lorsque les microtubules sont dépolymérisés, on peut facilement observer que la tubuline soluble se concentre rapidement dans la région du fuseau après la NEBD. Dans notre étude, nous avons montré que Ran et TBCE sont des protéines clés impliquées

dans ce processus chez la drosophile. dTBCE est essentielle pour que la tubuline soluble s'accumule dans la région du fuseau mitotique afin que les microtubules polymérisent autour de la chromatine. Cependant, il semble peu probable que dTBCE et la tubuline « voyagent » ensemble car dTBCE est accumulé en premier dans l'espace nucléaire suggérant un processus séquentiel. Dans une autre étude, l'accumulation de TBCE au niveau de l'appareil de golgi est nécessaire chez la souris afin de permettre la nucléation des microtubules (Schaefer et al., 2007). La même équipe a montré que la localisation de TBCE au niveau de ces sites de nucléation est dépendant d'une GTPase, ARF1 (Bellouze et al., 2014). En raison de la faible abondance de  $\gamma$ -TuRC au niveau de la chromatine (et de l'appareil de Golgi), la nucléation des microtubules peut nécessiter une concentration locale élevée d'hétérodimères fonctionnels, ce qui pourrait probablement être médié par l'accumulation de TBCE à ces différents sites de nucléation.

#### I.D.4 L'accumulation des protéines dans l'espace nucléaire dans les mitoses semi-ouvertes

Plusieurs espèces, telles que *D. melanogaster* ou *C. elegans* ont des mitoses dites « semi-ouverte » où l'enveloppe nucléaire ne disparaît pas complètement après la NEBD. Nous avons analysé la dynamique de différents composants de l'enveloppe nucléaire dans l'espace et le temps. Nous n'avons pas observé de différences de la quantité totale des membranes de l'enveloppe nucléaire au cours de la mitose en regardant CD8 étiqueté avec la GFP, un marqueur qui permet de visualiser toutes les membranes cellulaires. Ainsi chez la drosophile, ce marqueur a permis de mettre en évidence une forte compartimentation entre la région du fuseau mitotique et le cytoplasme (Figure S8A). En revanche, en observant des composants spécifiques de l'enveloppe nucléaire, (la lamine et Nup107) nous avons observé que ces deux composants se dissocient différemment. La lamine est progressivement dissociée dans la matrice du fuseau jusqu'en anaphase (Figure S8C). En revanche, Nup107 est rapidement accumulée dans la région du fuseau directement après la NEBD. Par conséquent, nous observons que les composants de l'enveloppe nucléaire ne se désassemblent de manière différentielle après la NEBD. Le rôle de l'enveloppe nucléaire résiduelle et des membranes représente probablement une contrainte pour l'entrée de molécules dans la future région du fuseau. Ces résultats sont en accord avec des études proposant que les composants de la

membrane constituant une barrière physique autour du fuseau mitotique pendant la mitose (Civelukoglu-Scholey et al., 2010; Strunov et al., 2018). Pour ces raisons de compartimentations, nous proposons donc qu'un mécanisme de concentration soit nécessaire pour la formation des microtubules du fuseau mitotique. Ce mécanisme ferait intervenir Ran et dTBCE et aurait pour but d'incorporer les éléments nécessaires pour assembler le fuseau mitotique.

De façon similaire à ce que nous avons observé pour dTBCE, de nombreuses molécules s'accumulent dans la région du fuseau mitotique après la NEBD. Nous avons étudié le temps d'enrichissement de quelques-unes de ces protéines potentiellement intéressantes tel que la nucléoporine Nup107. dTBCE et Nup107 sont toutes les deux accumulées au niveau de l'enveloppe nucléaire en prophase. A la NEBD, ces protéines s'accumulent dans l'espace nucléaire et colocalisent pendant la prométaphase. De façon similaire dans la littérature, des kinases (CDK-1, Polo et Aurora-A) sont également accumulées en amont des protéines citées précédemment (Toya et al 2011). Ceci suggère une régulation en cascade du recrutement des protéines dans la région du fuseau. La protéine msps, l'orthologue chez la drosophile de ChTOG/XMAP215, possède également la propriété d'être accumulée dans la région du fuseau pendant la mitose. Cependant, cet enrichissement intervient après l'accumulation de la tubuline (données non montrées), ce qui permettrait de stimuler la nucléation des microtubules. Par conséquent, ces données suggèrent qu'un recrutement séquentiel des MAPs au sein de la région du fuseau pourrait contrôler l'assemblage du fuseau mitotique dans le temps et l'espace.

Le mécanisme exact de ce recrutement séquentiel reste à démontrer. Cependant l'hypothèse de transition de phase est intéressante. En effet, de récentes recherches suggèrent que de certaines protéines intrinsèquement désordonnées peuvent former des gouttelettes non miscibles avec le cytoplasme (Brangynne et al., 2009; Elbaum-Garfinkle et al., 2015; Pak et al., 2016; Patel et al., 2016). Une fois ces gouttelettes formées, d'autres protéines nommées « clientes » peuvent s'y accumuler, où elles sont concentrées. Cette concentration de protéines clientes permet de catalyser des réactions biologiques comme la nucléation des microtubules (Banjade et Rosen, 2014; Jiang et al., 2015; Li et al., 2012; Su et al., 2016). Nous nous sommes demandé si la protéine TBCE

pouvait jouer un rôle dans la mise en place de la transition de phase autour des chromosomes ou comme une protéine cliente. Afin de vérifier cette hypothèse nous pourrions purifier TBCE puis ajouter du PEG (Polyéthylène glycol) pour déterminer si cette protéine forme des gouttelettes *in vitro*. Cependant nous envisageons une seconde hypothèse plus plausible. Il a récemment été montré que le pore nucléaire semble agir comme une transition de phase. En effet, certaines Nups tel que Nup98 ont la capacité de former ces « gels » *in vitro* grâce à leurs domaines riches en glycine et phénylalanine (FG) qui forment une barrière sélective et permettent le passage des importines et de leurs cargos (Hülsmann et al., 2012; Schmidt and Görlich, 2015; Frey et al., 2018). Nous avons mis en évidence par spectrométrie de masse que dTBCE interagit avec de nombreuses Nups dont certaines d'entre elles tel que Nup107 sont accumulées dans la région du fuseau après la NEBD. Par conséquent, il est possible que les domaines FG des Nups participent à la transition de phase dans la région du fuseau mitotique pendant la mitose. Cette transition de phase dépendante des Nups serait « un recyclage fonctionnel » des Nups pendant la mitose, ce qui participerait à l'accumulation séquentielle des protéines clientes tel que TBCE puis la tubuline. Cependant cette idée reste à démontrée.

#### I.D.5 Mécanisme proposé

Chez les vertébrés (mitose ouverte), la prométaphase est la phase de la mitose qui débute avec la rupture de l'enveloppe nucléaire et se finit avec l'attachement de tous les kinétochores des chromosomes par les microtubules. Chez les organismes aux mitoses semi-ouvertes tel que la drosophile (qui possède des membranes nucléaires résiduelles), nous proposons que des mécanismes se mettent en place pendant cette phase de mitose. Durant cette période, un changement de l'environnement moléculaire autour de la chromatine va permettre la polymérisation optimale des microtubules. Sur la base de nos résultats nous proposons le scénario suivant dans la mise en place de l'assemblage du fuseau mitotique pendant la prométaphase. Dès la NEBD, certaines protéines se retrouvent rapidement accumulées dans la région du fuseau mitotique tel que dTBCE et les nucléoporines formant un milieu sélectif qui permet de recruter la tubuline soluble dans la région du fuseau mitotique. Notre étude montre que cette accumulation de tubuline soluble est importante pour stimuler la nucléation des

microtubules autour des chromosomes. Le gradient Ran joue un rôle essentiel dans tout ce processus en régulant précisément le recrutement séquentiel de tous ces acteurs même si le mécanisme exact n'est pas connu. De futures études seront nécessaires afin de voir si ces mécanismes sont conservés chez les mammifères.

## I.E Figures et Légendes :

### ***Figure 1: dTBCE est nécessaire pour le développement du tissu neural et l'assemblage du fuseau mitotique dans les Nbs de drosophile.***

A) Analyse des niveaux de dTBCE, l' $\alpha$ -tubuline, la  $\beta$ -tubuline et l'actine dans le système nerveux central de drosophiles contrôles ou exprimant des ARNi dTBCE. Deux lignées d'ARNi ont été utilisées (KK et GD), seules ou en combinaison afin d'amplifier la déplétion de dTBCE. Toutes les images représentées ont été sélectionnées avec la double déplétion (KKK et GD) B) Vue d'ensemble des lobes optiques des cerveaux contrôles (panneaux de gauche) et dTBCE ARNi (panneaux de droite) immunomarkés pour la tubuline (rouge), la Lamine (bleu) et l'Histone phospho-H3 (PH3, panneaux verts et inférieurs en monochrome). Le contour du lobe est affiché avec une ligne en pointillé dans les panneaux inférieurs. Les lobes dTBCE ARNi présentent des défauts de croissance par rapport aux contrôles et à un nombre élevé de cellules mitotiques. Barre d'échelle: 100 $\mu$ m. C) Images sélectionnées de mitoses marquées au DAPI provenant de cerveaux contrôle (à gauche) ou dTBCE ARNi (à droite). Les images proviennent de la combinaison des deux ARNi. Les chromosomes sont souvent hypercondensés dans les cerveaux dTBCE ARNi. La barre d'échelle est de 10 $\mu$ m. D) Histogramme montrant l'index mitotique ( $\pm$  écart type) dans les cerveaux contrôles:  $0,73 \pm 0,16$  (n=13095, 3 cerveaux) ou dans les cerveaux de dTBCE ARNi: KK  $2,39 \pm 0,35$  (n=11535, 4 cerveaux), GD:  $1,95 \pm 0,21$  (n=6329, 2 cerveaux) et KK+GD:  $3,75 \pm 0,35$  (n=6319, 2 cerveaux). E) Nbs en métaphase dans un cerveau contrôle et dTBCE ARNi. Les microtubules sont en rouge, l'ADN est en vert et la lamine est en bleu. Notez la diminution de la densité de microtubules dans le fuseau mitotique dans les Nbs dTBCE ARNi (à droite) par rapport aux contrôles (à gauche) F) Quantification de la longueur des fuseaux mitotiques dans les Nbs contrôles ( $12,1 \mu\text{m} \pm 1,5$ , n=17) ou dTBCE ARNi (KK:  $10,5 \mu\text{m} \pm 1,8$ , n = 17 ; GD:  $10,2 \mu\text{m} \pm 1,3$ , n=14 ; KK+GD:  $9,0 \mu\text{m} \pm 1,8$  n=25). (G) Mitose dans les Nbs contrôles (panneaux supérieurs) ou dans des Nbs déplétés pour dTBCE (panneaux inférieurs) exprimant la  $\beta$ -tubuline-GFP. Notez le délai du temps de mitose calculé entre la NEBD et le début de l'anaphase après la déplétion de dTBCE. Le temps est écrit en min: sec. La NEBD et l'apparition anaphase sont indiqués. Barre d'échelle: 10 $\mu$ m. (H) Graphique ( $\pm$  Ecart type) indiquant la durée de la mitose dans les Nbs contrôles ( $5,1 \pm 0,6$  ; n=67) et les

dTBCE ARNi (KK:  $6,1 \pm 0,8$  min ; n=45, GD:  $6,1 \pm 0,8$  n=17 ; KK+GD:  $7,0 \text{ min} \pm 1,0$  n=32). \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .

***Figure 2: dTBCE est essentiel pour la polymérisation des microtubules autour de la chromatine.***

A) Schéma illustrant les différentes étapes du test au froid. Les cerveaux des drosophiles ont été disséqués dans le milieu Schneider et incubés sur de la glace pendant 30 min pour induire la dépolymérisation totale des microtubules. Les microtubules sont capables de repolymériser par le passage de la température à 25°C. Les cerveaux ont été fixés à 30 secondes, étape au cours de laquelle la nucléation des microtubules peut être visualisée au niveau des centrosomes et autour de la chromatine. 90sec après le retour à 25°C, le fuseau mitotique bipolaire est parfaitement normal. Les centrosomes sont dessinés en gris, les microtubules en rouge et l'ADN en bleu. B) Images représentatives de Nbs mitotiques de cerveaux contrôles (panneaux de gauche) et dTBCE ARNi (panneaux de droite) pendant la repolymérisation des microtubules après une dépolymérisation des microtubules par le froid (voir Méthodes). Les échantillons ont été fixés immédiatement après la dépolymérisation (0sec, panneau de gauche) mais aussi 30sec (panneau du milieu) et 90sec (panneau de droite) après une incubation à 25°C. La tête flèche rouge indique la nucléation des microtubules autour de la chromatine après 30sec, qui est absente lorsque dTBCE est déplété. Les microtubules sont représentés en rouge (panneaux supérieurs) et monochromes (panneaux inférieurs), l'ADN est affiché en bleu et la  $\gamma$ -tubuline en vert. C) Des métaphases de Nbs contrôles et dTBCE ARNi exprimant EB1-GFP ont été imagés par microscopie à haute résolution temporelle (0,5sec) et représentés dans les panneaux supérieurs. Une projection maximale correspondant à 20 images (10 sec) est affichée au centre. La vitesse des comètes a été mesurée par le logiciel u-track2.2.0 (Jaqaman et al., 2008). Nous n'avons pas trouvé de résultats significatifs entre les deux conditions (Contrôles :  $16,75 \mu\text{m}/\text{min}$  n=10; TBCE ARNi :  $16,11 \mu\text{m}/\text{min}$  n=12). Dans les panneaux inférieurs, les kymographes représentent l'intensité de fluorescence sur la longueur du fuseau mitotique pendant une minute. Les flèches indiquent la position des centrosomes. D) Histogramme montrant le ratio d'intensité de fluorescence EB1-GFP entre la région du fuseau et le centrosome, pour des Nbs en métaphases contrôles ( $0,84 \pm 0,16$ , n=7) et des

dTBCE ARNi ( $0,46 \pm 0,14$ ,  $n=14$ ). E) Analyses par Western blot montrant les taux de protéine dTBCE (en haut), EB1-GFP (au milieu) et d'actine (en bas) dans les cerveaux contrôles ou dTBCE ARNi. F) Images sélectionnées d'immunofluorescences de Nbs mitotiques contrôles (panneaux à gauche) et dTBCE ARNi (panneaux à droite) après un traitement d'1h avec du taxol à une concentration de  $20\mu\text{M}$ . Les microtubules sont représentés en rouge (panneaux supérieurs et monochromes dans les panneaux inférieurs), l'ADN est affiché en vert et la Lamine en bleu. G) Graphique représentant les résultats de quantification de la quantité de fluorescence représentant la quantité totale de tubuline polymérisée dans des Nbs contrôles ( $5602\text{a.u} \pm 2056$ ;  $n=35$ ) et dTBCE ARNi ( $3025\text{a.u} \pm 2707$ ;  $n=25$ ). ns : non significatif. Barres d'échelles:  $10\mu\text{m}$ . \*\*\*:  $p < 0,001$

***Figure 3: Localisation de dTBCE dans les embryons syncytiaux de drosophile au cours de la mitose.***

A) Western blot de dTBCE avec des extraits d'embryons de drosophile (sérum pré-immun PI, à gauche et immun I, à droite). B) Localisation de dTBCE pendant la prophase, après NEBD, la métaphase et l'anaphase. Les embryons ont été immunomarqués pour dTBCE (vert), la tubuline (rouge), la lamine (violet) et l'ADN (bleu). Chaque canal est également affiché en monochrome. C) Analyse montrant l'intensité de fluorescence relative de chaque fluorophore suivant l'axe entre les deux pôles de fuseau (ligne blanche dans l'image) d'une cellule métaphasique « indiquée » par la flèche dans le panneau B. Notez l'enrichissement en dTBCE dans la région du fuseau mitotique. Barres d'échelles:  $10\mu\text{m}$ .

***Figure 4: Le domaine CAP-Gly est essentiel pour la localisation de dTBCE.***

A) dTBCE contient un motif CAP-Gly N-ter, un domaine riche en leucine et un domaine ubiquitine-like en C-ter (en haut). Dynamique de dTBCE-GFP (vert et monochrome dans les panneaux de droite) et tubuline-RFP (rouge et monochrome dans les panneaux du milieu), exprimée au cours d'un cycle mitotique complet d'un embryon syncytial. Notez que les deux protéines sont exprimées sous le contrôle d'un promoteur de la poly-ubiquitine dans un mutant *tbce*. dTBCE-GFP se situe sur les centrosomes et la membrane nucléaire pendant la prophase. Au cours de la NEBD, il s'enrichit rapidement dans

l'espace nucléaire et reste dans la région du fuseau mitotique jusqu'au prochain cycle. B) Quantification de l'intensité de fluorescence le long de l'axe entre les deux centrosomes montrant les intensités de fluorescences normalisées de dTBCE-GFP et de la RFP-tubuline en prophase, prométaphase et métaphase d'une cellule d'un embryon syncytial. C) Embryon surexprimant dTBCE-GFP (vert et monochrome dans les panneaux de droite) et tubuline-RFP (rouge et monochrome dans les panneaux du milieu). D) La séquence d'acides aminés du motif conservé GKHN du domaine CAP-Gly de dTBCE a été mutée en GAAN (appelée TBCE<sup>mutCG</sup>-GFP). La protéine mutée n'est plus associée à la membrane nucléaire en prophase et n'est plus capable de s'enrichir dans l'espace nucléaire après la NEBD. De plus, nous ne visualisons plus son association avec les microtubules pendant la métaphase. Nous avons utilisé la lignée V32CGAL4 afin de surexprimer les protéines dans les panneaux C et D (Voir Western Blot Figure S4). Barres d'échelles: 10µm.

**Figure 5 : dTBCE interagit avec les protéines du gradient Ran et les nucléoporines via son domaine CAP-Gly.**

A) Réseau d'interaction protéique de dTBCE pour les protéines les plus enrichies dans les immunoprécipitations. Ce cluster a été construit à l'aide de l'outil STRING (<http://string-db.org>). Les protéines retenues pour le schéma présentaient un indice de confiance élevée (score≥0,7). B) Liste des gènes utilisés pour le schéma en A). C) Des immunoprécipitations ont été effectuées grâce à des billes anti-GFP avec des extraits de cellules S2 exprimant la GFP, TBCE-GFP, TBCE<sup>mutCG</sup>-GFP. Les différents interacteurs potentiels de dTBCE ont été analysés par Western blot avec des anticorps dirigés contre la GFP, l'importine-α2, l'α-tubuline et Ran.

**Figure 6 : dTBCE est impliqué dans l'accumulation de la tubuline soluble autour de la chromatine.**

A) Images représentant les billes suite à des immunoprécipitations de lignées transgéniques exprimant la GFP, TBCE-GFP et TBCE<sup>mutCG</sup>-GFP à partir d'extraits d'embryons avec des billes anti-GFP. Les billes ont été incubées avec de la tubuline pure (contenant 10% de tubuline rhodamine). B) Quantification de la fluorescence GFP (GFP :

217,4au±56,0 n=42; TBCE-GFP : 229,9au±104,4 n=31 et TBCE<sup>mutCG</sup>-GFP 226,2au±76,6 n=42) ainsi que la rhodamine (GFP : 0,4au±0,7 n=42; TBCE-GFP : 25,9au±6,2 n=31 et TBCE<sup>mutCG</sup>-GFP 4,7au±4,0 n=42) à la surface des billes. C) Nbs contrôle (panneaux supérieurs) et dTBCE ARNi (panneaux inférieurs) exprimant cherry- $\alpha$ -tubuline après un traitement avec de la colchicine. Notez la diminution de l'enrichissement de la tubuline dans la région du fuseau (pointillé fin) au cours du temps lorsque dTBCE est déplété. D) Courbe représentant la différence entre la fluorescence de la région nucléaire avec le cytoplasme (a.u) au cours du temps. ns : non significatif, \*\*\* =  $p < 0,001$ . Barres d'échelles : 10 $\mu$ m.

***Figure S1 : La déplétion de dTBCE et MAD2 raccourcit le temps de mitose et induit des défauts de ségrégation des chromosomes pendant l'anaphase.***

A) Cellules en mitoses à partir de cerveaux (marquage DAPI). Les mitoses de cellules contrôles (en haut à gauche), déplétée pour dTBCE (en haut à droite), déplétée pour Mad2 (en bas à gauche) ou avec une double déplétion dTBCE et Mad2 (en bas à droite). La flèche indique un chromosome surnuméraire. B) Histogramme montrant l'index mitotique ( $\pm$  écart type) dans les cerveaux contrôles:  $0,73 \pm 0,16$  (n=13095, 3 cerveaux), dans les cerveaux dTBCE ARNi: KK  $2,39 \pm 0,35$  (n=11535, 4 cerveaux), Mad2 ARNi  $0,73 \pm 0,07$  (n=7655, 3 cerveaux) et dTBCE KK+ARNi Mad2  $0,73 \pm 0,11$  (n=10690, 4 cerveaux). C) Nbs en mitoses exprimant la tubuline-GFP, déplétés pour dTBCE, Mad2 ou dTBCE + Mad2 (les génotypes sont indiqués à gauche, la NEBD et l'apparition anaphase sont aussi indiqués). Le temps est min: sec. D) Dot plot ( $\pm$  Ecart Type) montrant la durée de la mitose chez le témoin ( $5,1 \pm 0,6$  ; n=67), les ARNi dTBCE KK ( $6,1 \pm 0,8$  ; n=45), les ARNi Mad2 ( $5,1 \pm 0,9$  ; n=13) et dans les cerveaux dTBCE KK+ARNi Mad2 ( $5,3 \pm 0,8$  ; n=30). Les temps de mitoses sont calculés de la NEBD jusqu'au début de l'anaphase \*\*\*  $p < 0,0001$ , ns= non significatif. E) Images de Nbs en anaphase immunomarqués pour la tubuline (rouge) et les histones phospho-H3 (PH3, vert) afin de visualiser les défauts de ségrégation de chromosomes. Le génotype est indiqué en haut de chaque image. Les contrôles (0/21), l'ARNi dTBCE KK (0/17) et l'ARNi Mad2 (0/11) ne présentent pas d'anomalies de ségrégation chromosomique. En revanche, 30% des cellules (4/17) déplétées pour dTBCE et Mad2 présentent des chromosomes mal ségrégés. Barres d'échelles : 10 $\mu$ m.

***Figure S2 : La surexpression de dTBCE (dTBCEOE) n'entraîne pas de défaut d'assemblage du fuseau mitotique.***

A) Western Blot montrant les niveaux d'expression de dTBCE, l' $\alpha$ -tubuline et l'actine dans le système nerveux central de drosophiles contrôles ou surexprimant dTBCE (dTBCEOE). B) Nbs en métaphase dans un cerveau contrôle (à gauche) et dTBCEOE (à droite). Les microtubules sont en rouge, l'ADN est en vert et la lamine est en bleu. C) Mitose dans les Nbs contrôles (panneaux supérieurs) ou dans des Nbs dTBCEOE (panneaux inférieurs) exprimant la  $\beta$ -tubuline-GFP. Le temps est écrit min: sec. La NEBD et le déclenchement de l'anaphase sont indiqués. Barre d'échelle : 10 $\mu$ m. (D) Graphique ( $\pm$  Ecart type) montrant la durée de la mitose dans les Nbs contrôles ( $5,1 \pm 0,6$  ; n=67) et les dTBCEOE ( $4,9 \pm 0,5$  ; n=25). E) Images sélectionnées d'immunofluorescences de Nbs mitotiques contrôles (panneaux à gauche) et dTBCEOE (panneaux à droite) après un traitement d'1h avec du taxol à une concentration de 20 $\mu$ M. Les microtubules sont représentés en rouge (panneaux supérieurs et monochromes dans les panneaux inférieurs), l'ADN est affiché en vert et la Lamine en bleu. F) Graphique représentant les résultats de quantification de la quantité de fluorescence représentant la quantité totale de tubuline polymérisée dans des Nbs contrôles ( $5602 \text{ a.u.} \pm 2056$  ; n=35) et TBCEOE ( $6136 \text{ a.u.} \pm 2795$  ; n=11). ns = non significatif. Barres d'échelles : 10 $\mu$ m

***Figure S3 : dTBCE colocalise avec les protéines de la « spindle matrix » pendant la métaphase.***

Localisation de dTBCE pendant la prophase, la métaphase et l'anaphase avec des protéines de la « spindle matrix » telles que A) Skeletor et B) Chromator. C) Cellules métaphasiques de cellules S2. Les embryons et cellules S2 ont été immunomarqués pour dTBCE (vert), la tubuline (rouge) et les protéines de la « spindle matrix » (en bleu). Notez la colocalisation de ces protéines dans la région du fuseau pendant la métaphase. Barres d'échelles : 10 $\mu$ m.

**Figure S4 : Les différentes constructions dTBCE et leurs niveaux d'expression.**

A) Représentation schématique des différentes lignées transgéniques de dTBCE produites avec les différentes séquences mutées. De haut en bas, TBCE-GFP contrôle, TBCE<sup>mutCG</sup>-GFP, TBCE<sup>HRD</sup>-GFP et TBCE<sup>mutNLS</sup>-GFP. B) Western Blot indiquant les niveaux de dTBCE (en haut) et d'actine (en bas) à partir d'extraits d'embryons des différentes lignées de drosophiles transgéniques utilisées dans le manuscrit. La flèche noire indique la taille de dTBCE endogène et la flèche verte la protéine étiquetée GFP.

**Figure S5 : dTBCE et Nup-107 s'accumulent dans la région du fuseau après la NEBD.**

A) Localisation de dTBCE-GFP (vert, monochrome dans les panneaux du milieu) et Nup107-RFP (magenta et monochrome dans les panneaux du bas). B) Analyse montrant l'intensité de fluorescence relative de chaque fluorophore le long de l'axe des deux centrosomes d'une cellule d'embryon syncytial de drosophile en prophase, prométaphase et métaphase. Notez les colocalisations de ces protéines dans la « spindle matrix » pendant la prométaphase/métaphase. Barres d'échelles : 10µm

**Figure S6 : Ran est impliqué dans l'accumulation de la tubuline soluble dans la région du fuseau après la NEBD.**

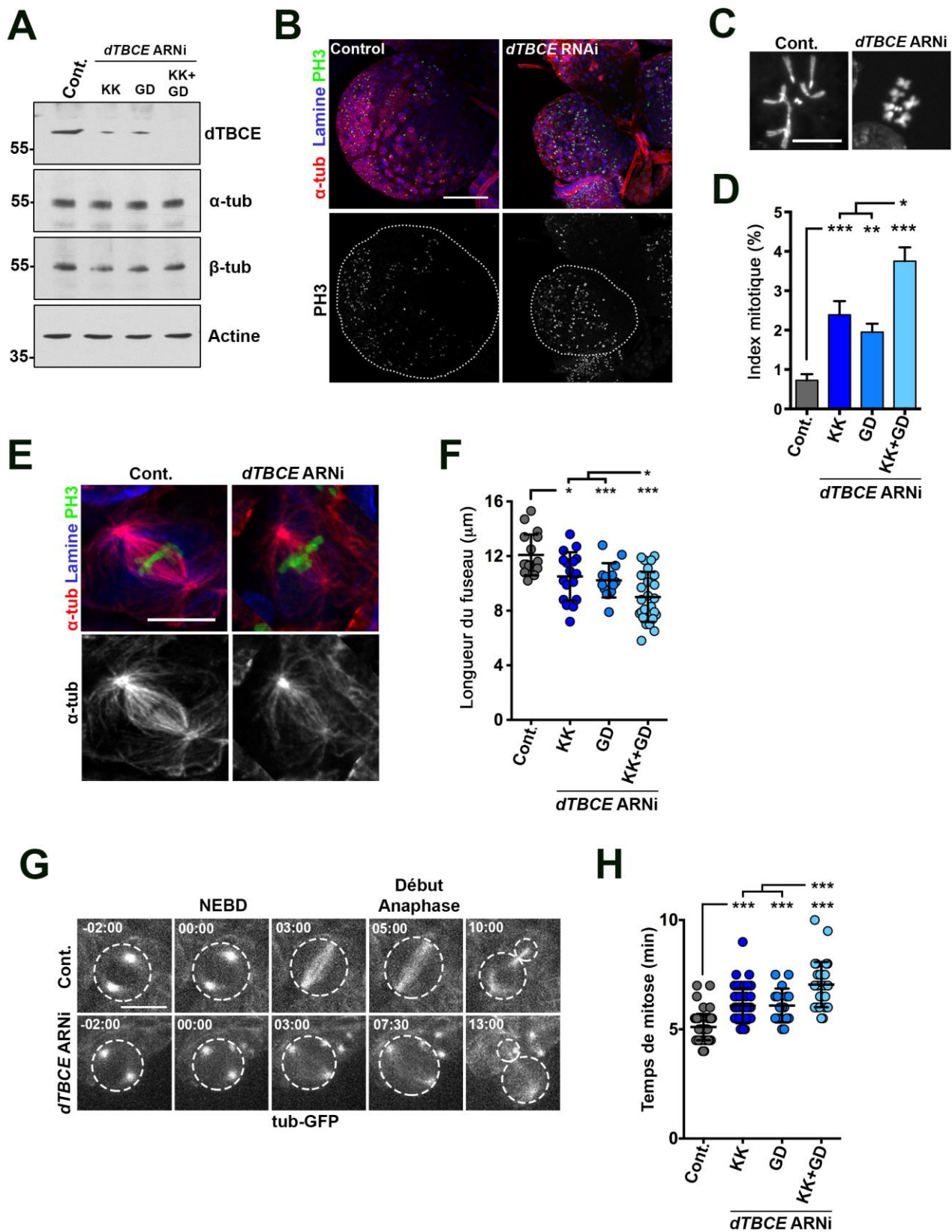
A) Nbs en métaphase dans des cerveaux contrôle et Ran ARNi. La déplétion de Ran entraîne une diversité de phénotypes dans les Nbs en métaphase. Ici sont représentés uniquement les différents phénotypes observés en métaphase avec la diminution plus ou moins importante de la densité de microtubules dans le fuseau mitotique. Les microtubules sont en rouge, l'ADN est vert et la lamine est bleu. B) Nbs contrôle (panneaux supérieurs) et Ran ARNi (panneaux inférieurs) exprimant cherry-α-tubuline après un traitement avec de la colchicine. C) Courbe représentant la différence entre la fluorescence de la région nucléaire avec le cytoplasme (a.u) au cours du temps dans les Nbs contrôles et déplétés pour Ran. Barres d'échelles : 10µm.

***Figure S7 : dTBCE s'accumule dans la région du fuseau en amont de la tubuline.***

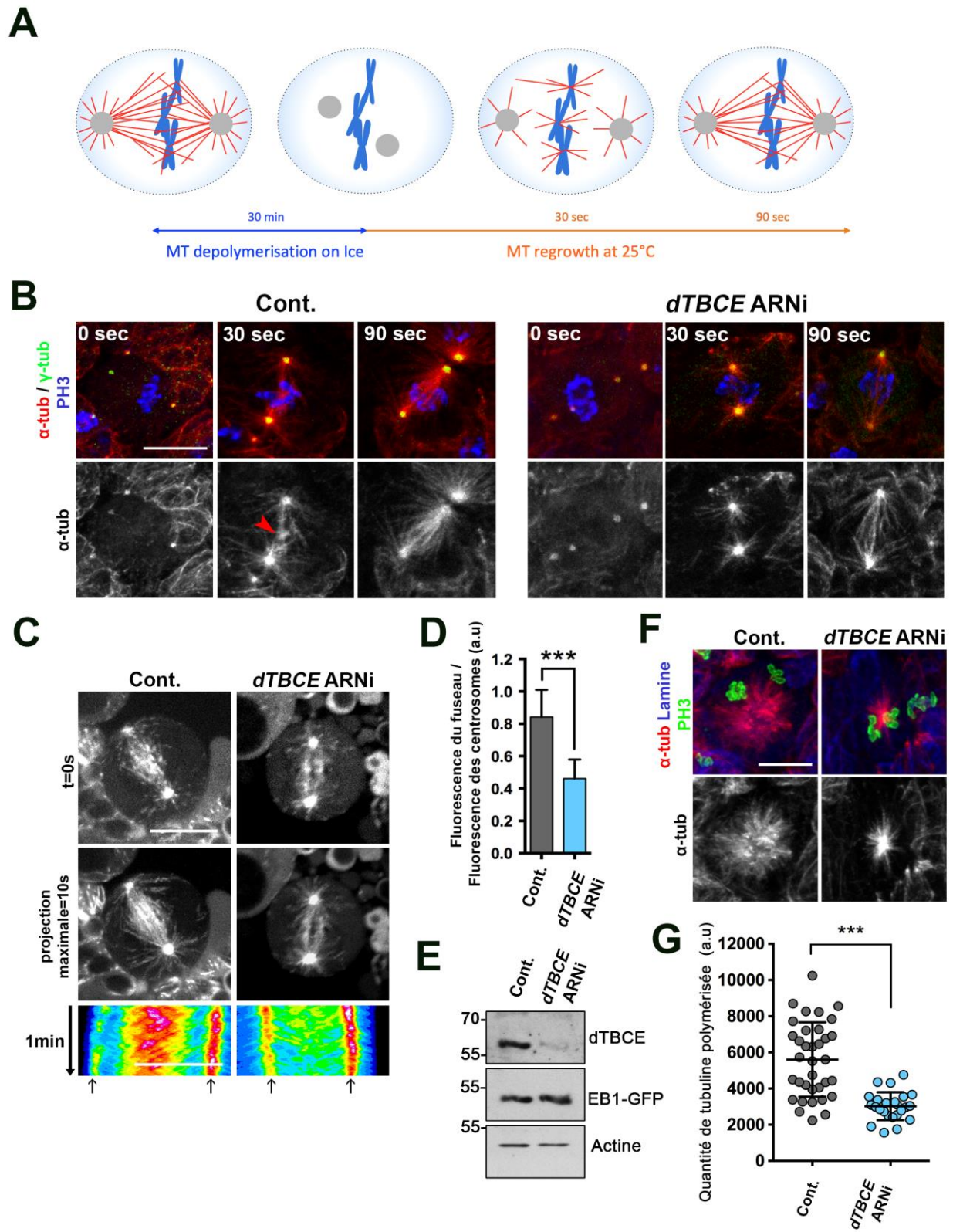
Dynamique de dTBCE-GFP (vert et monochrome dans les panneaux du milieu) et tubuline-RFP (rouge et monochrome dans les panneaux du milieu), exprimées dans des Nbs contrôles A) ou après un traitement avec de la colchicine B). A la NEBD (00 :00), dTBCE s'enrichit soudainement dans l'espace nucléaire dans la région du fuseau mitotique quelques secondes avant la tubuline indépendamment de la formation du fuseau mitotique. Barres d'échelles : 10µm.

***Figure S8 : Les composants de l'enveloppe nucléaire ne se désassemblent pas au même instant.***

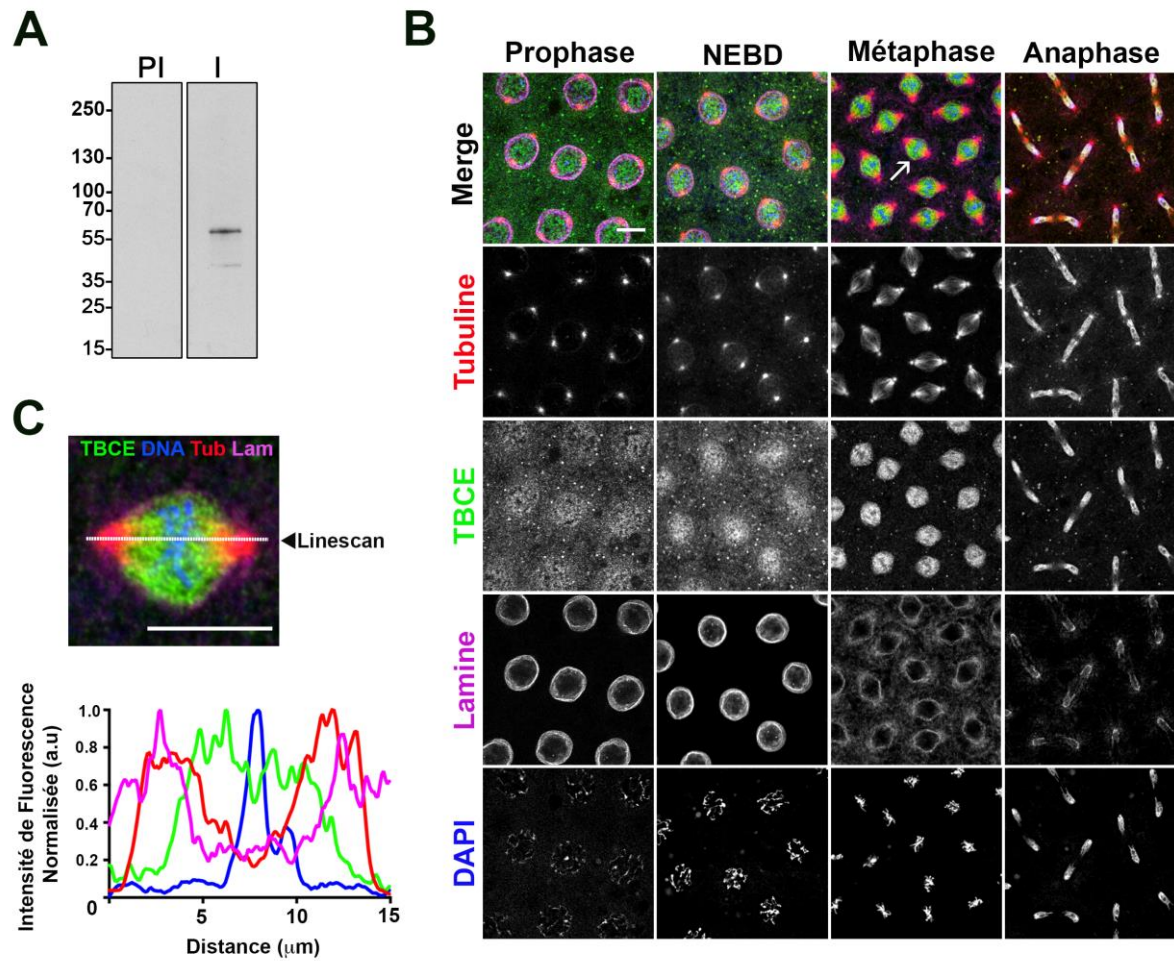
Dynamique des composants de l'enveloppe nucléaire (magenta et monochrome dans les panneaux inférieurs) et de la tubuline (cyan), exprimées au cours de divisions cellulaires de Nbs A) Mitose d'un Nb exprimant cherry-α-tubuline et CD8-GFP, une protéine membranaire permettant de visualiser toutes les membranes de la cellule. B) Mitose d'un Nb exprimant tubuline-GFP et Nup107-RFP, une protéine qui constitue le pore nucléaire. C) Mitose d'un Nb exprimant une cherry-α-tubuline et la Lamine-GFP, une protéine qui forme la lamina nucléaire. D) Quantification de la moyenne de fluorescence au niveau de l'enveloppe nucléaire au cours d'une mitose pour les différentes protéines (n=3 Nbs par marqueur). Notez que la quantité de fluorescence totale de CD8-GFP (jaune) au niveau de l'enveloppe nucléaire reste constante au cours de la mitose alors que la Nup107 (rose) est rapidement accumulée dans la « spindle matrix » pendant la prométaphase. La lamine-GFP (violet), quant à elle, se désassemble progressivement jusqu'à l'anaphase. Les cellules choisies pour les quantifications ont un temps de mitose (de la NEBD au début de l'anaphase) très proche 5min30±30sec. Barres d'échelles : 10µm.



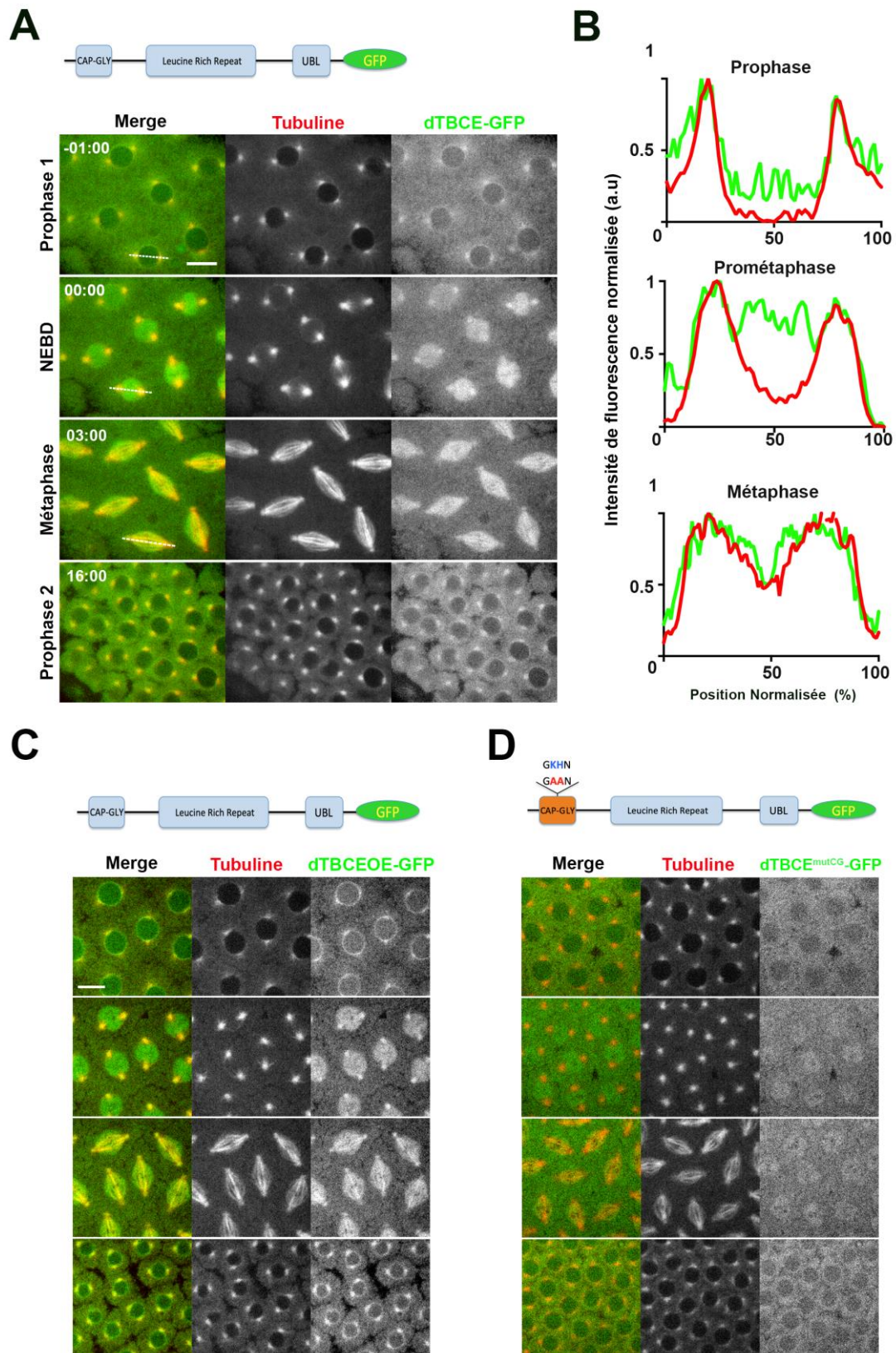
**Figure 1**



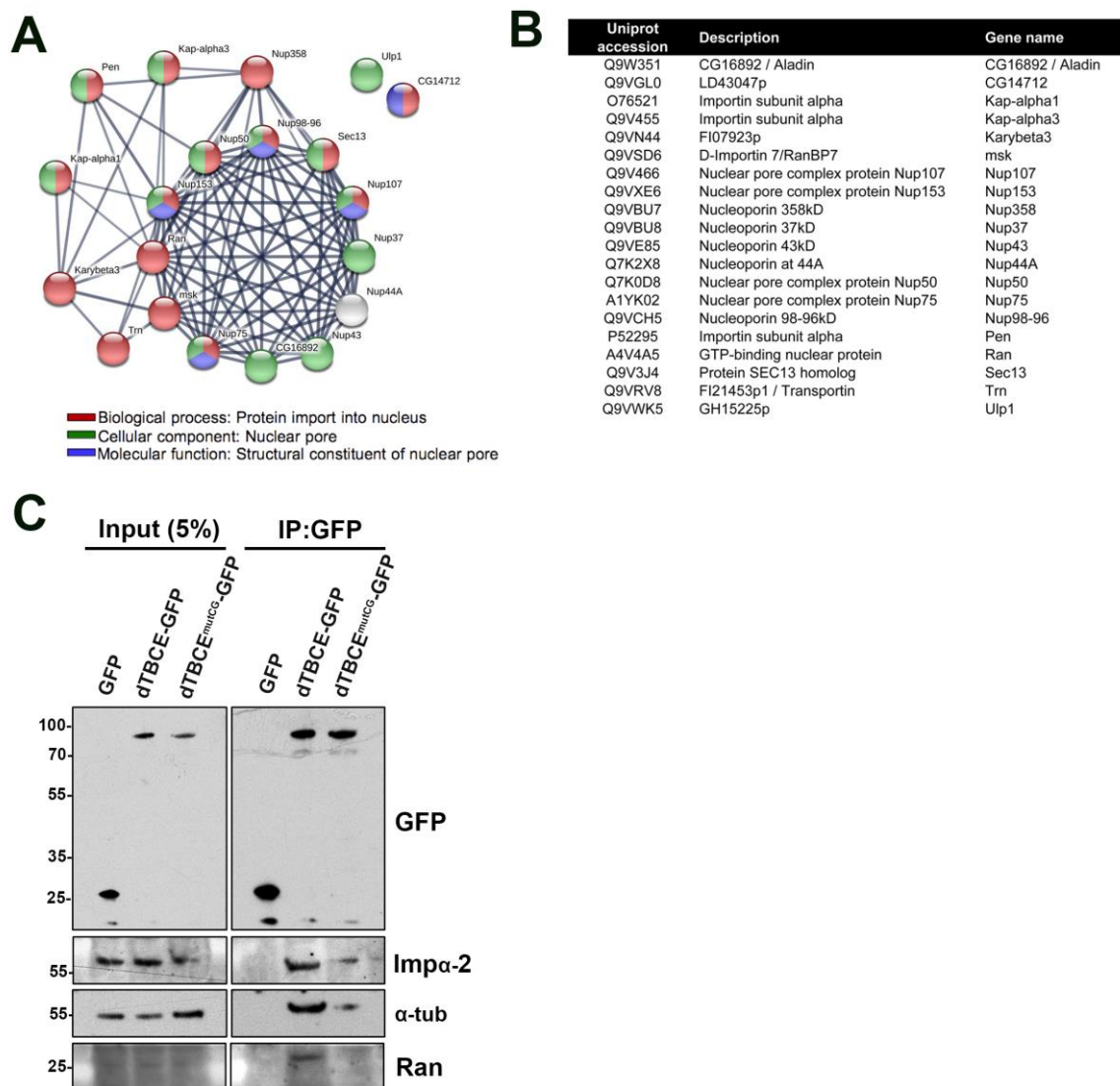
**Figure 2**



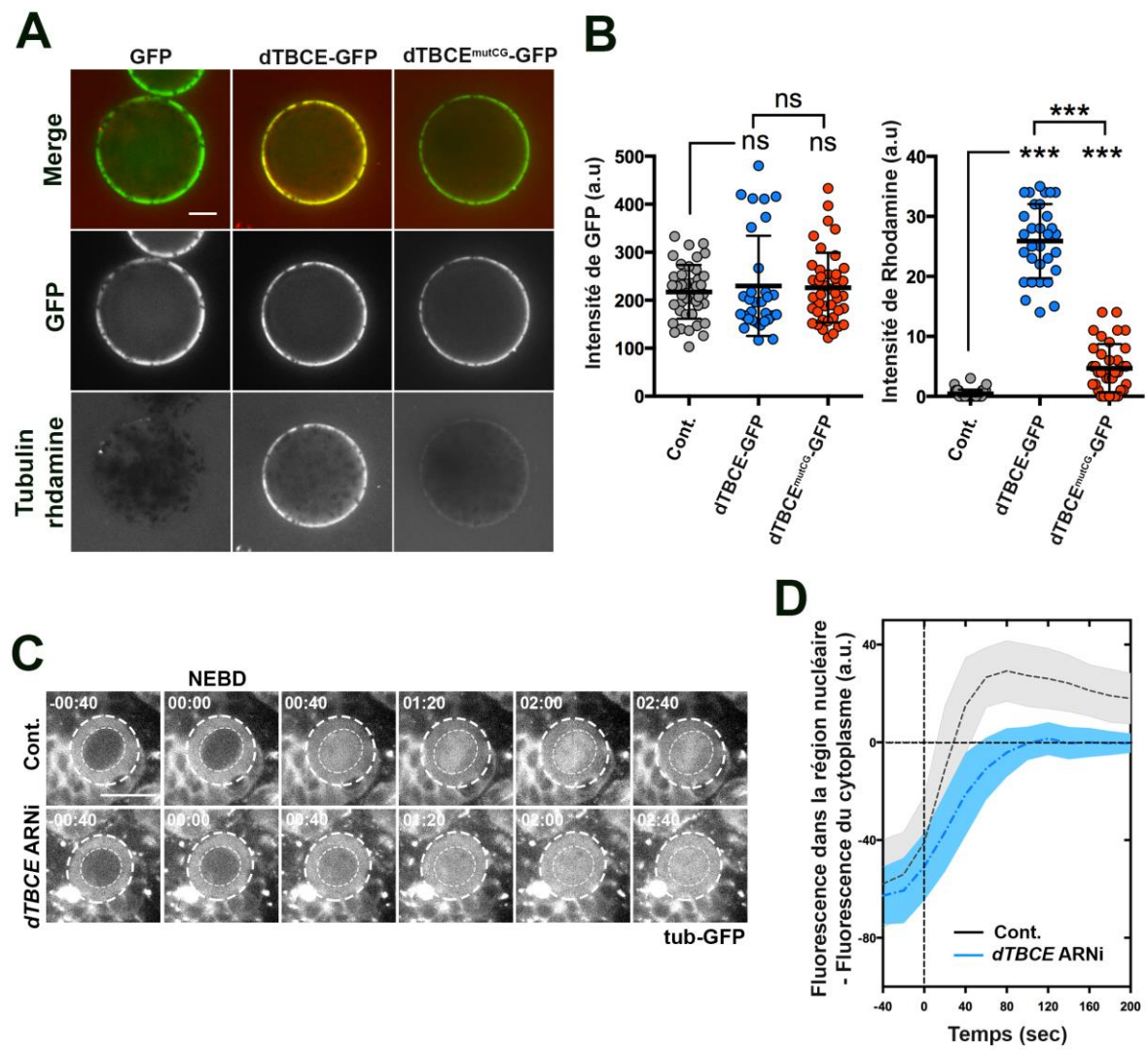
**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**



**Figure 6**

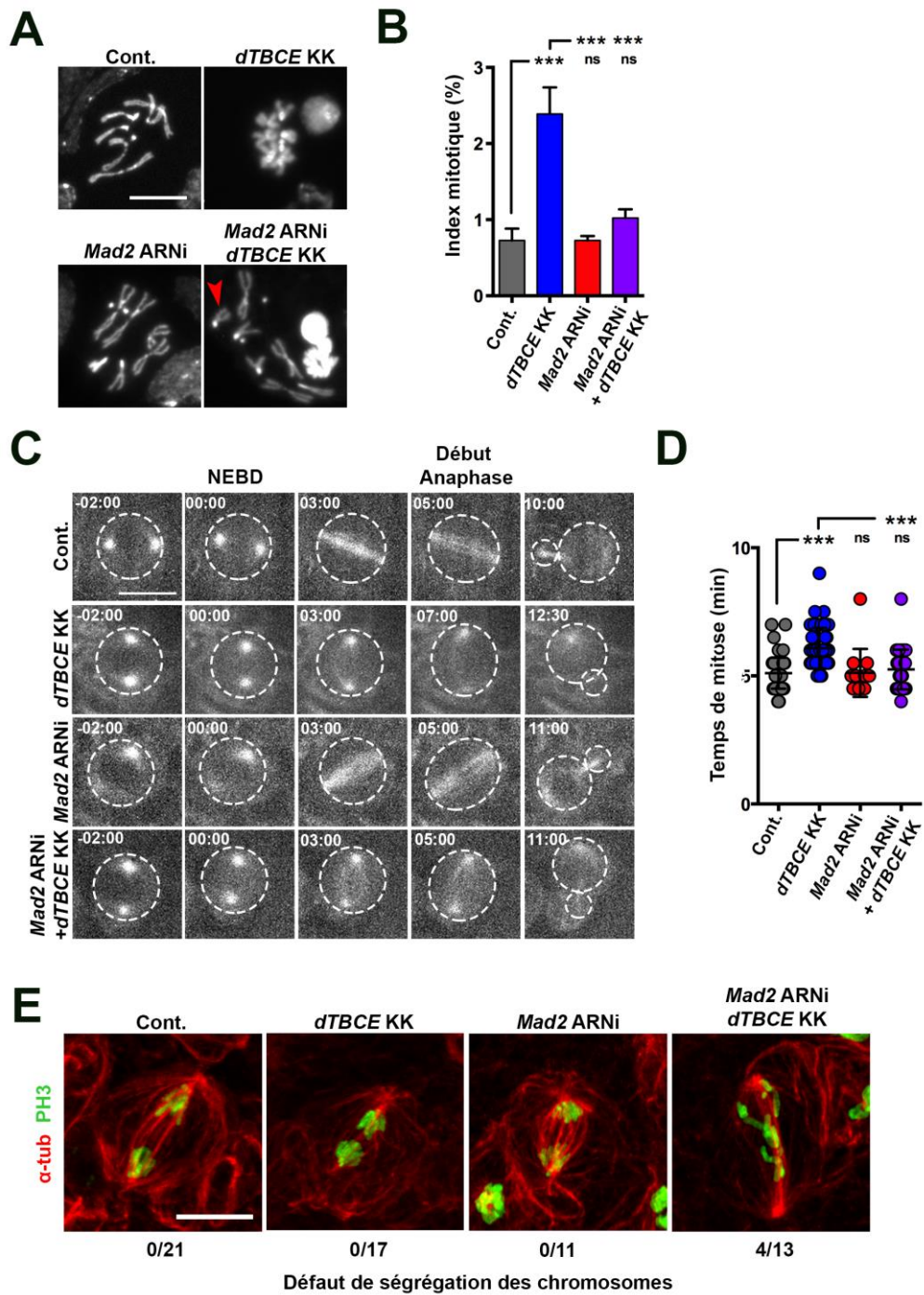
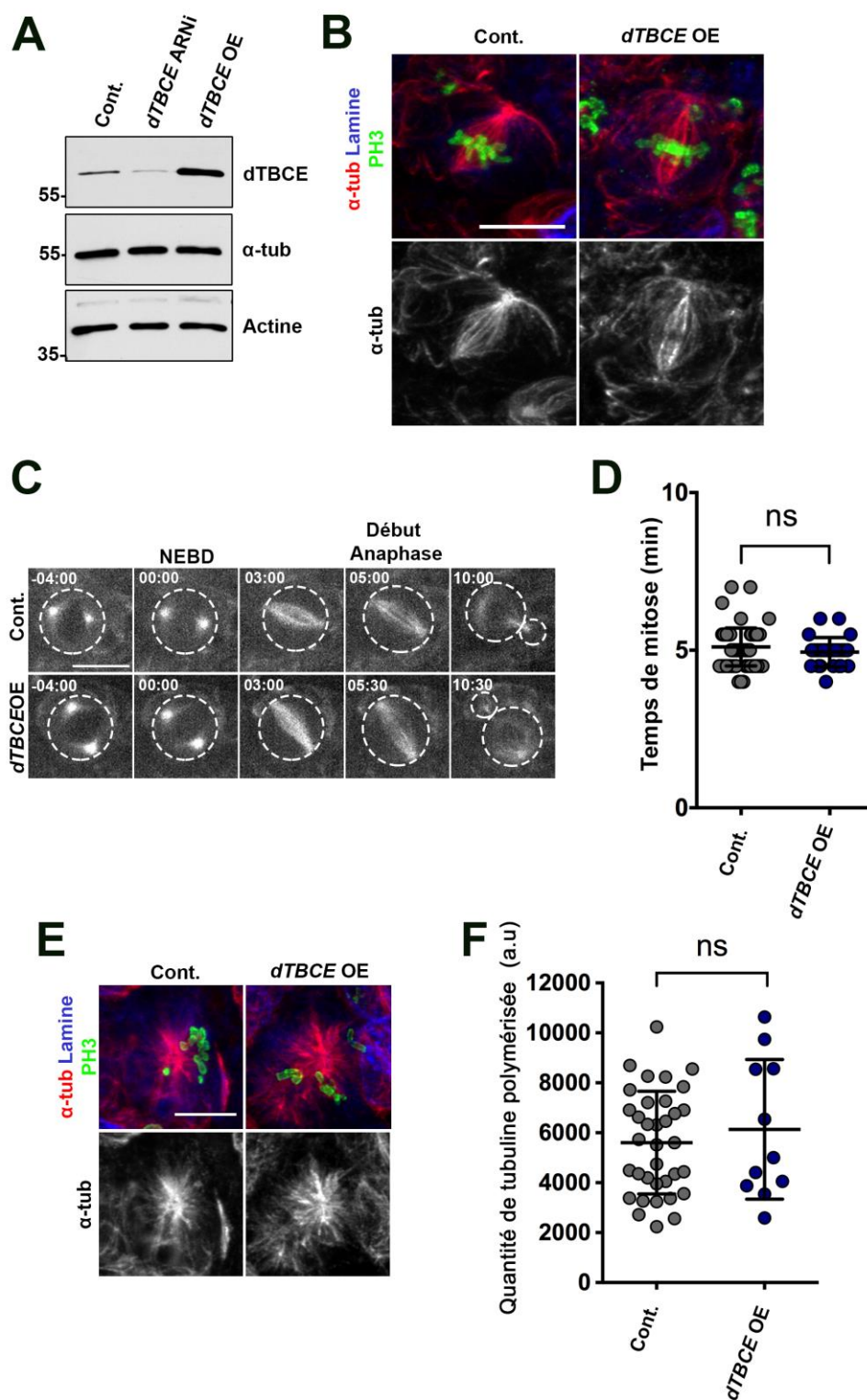
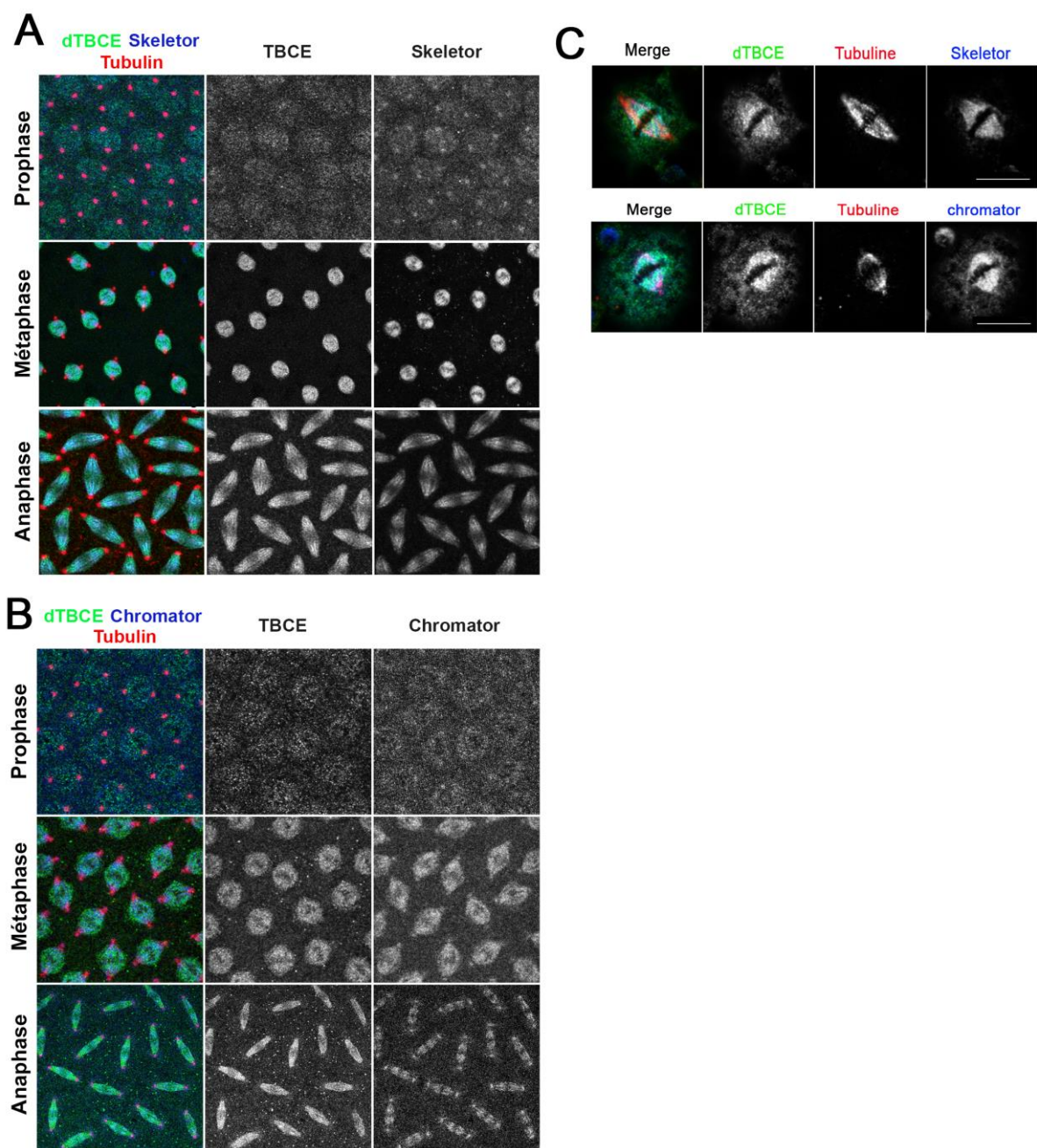


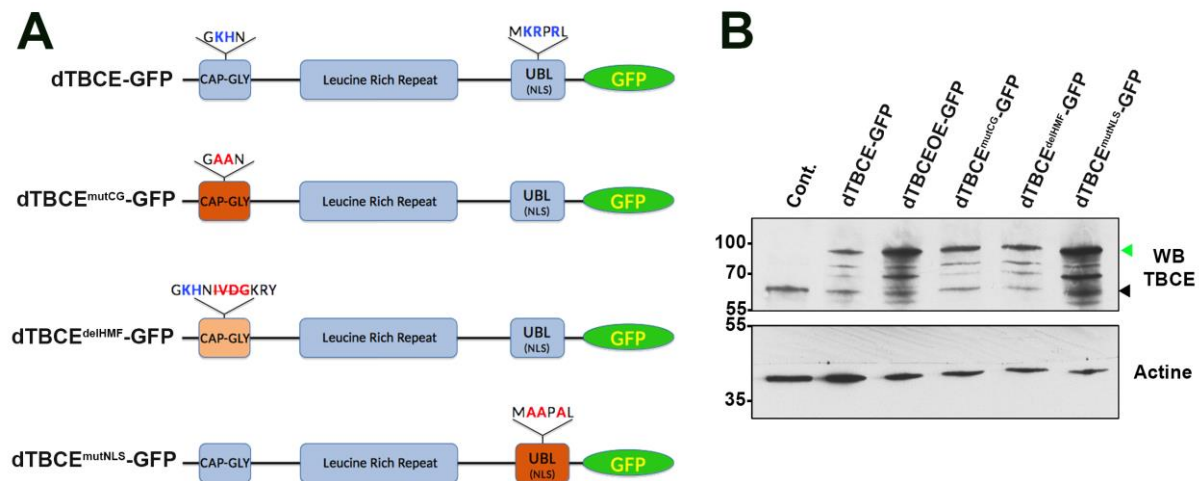
Figure S1



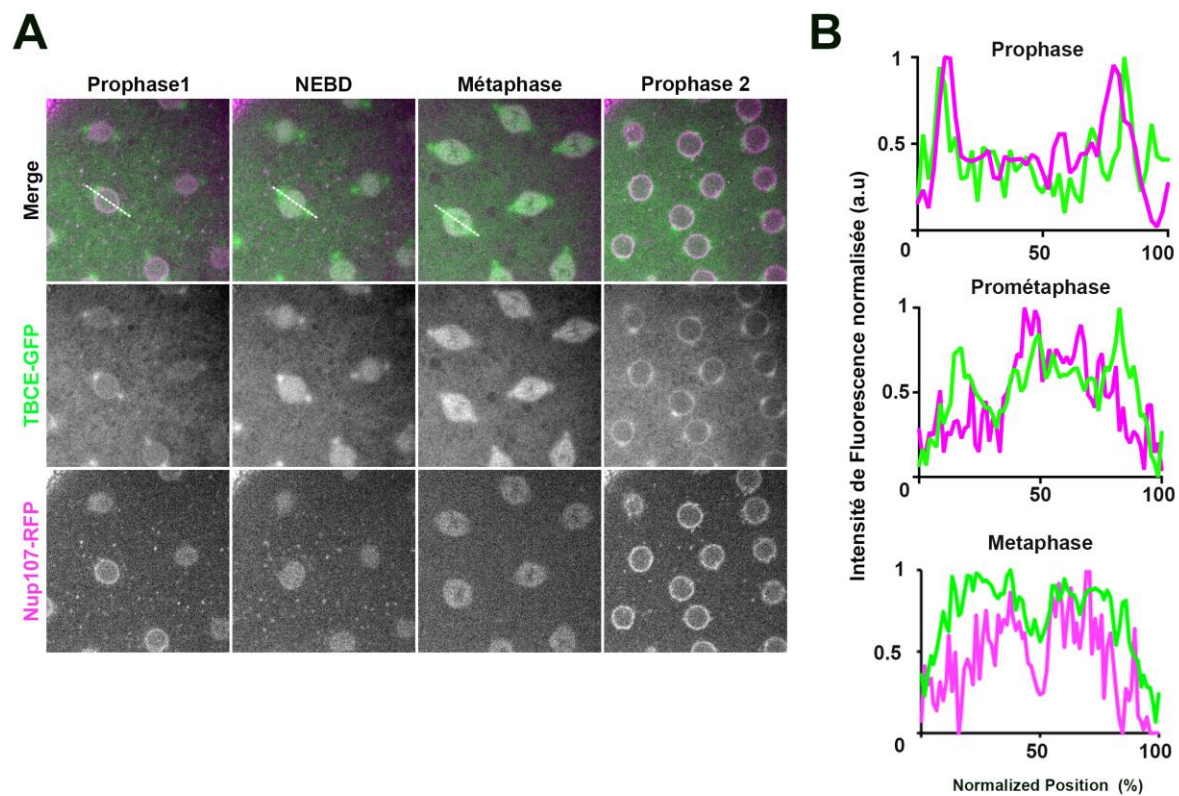
**Figure S2**



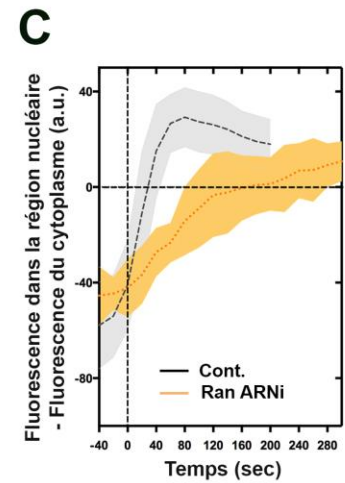
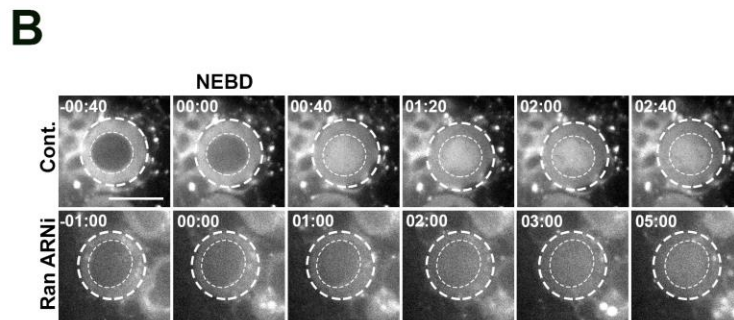
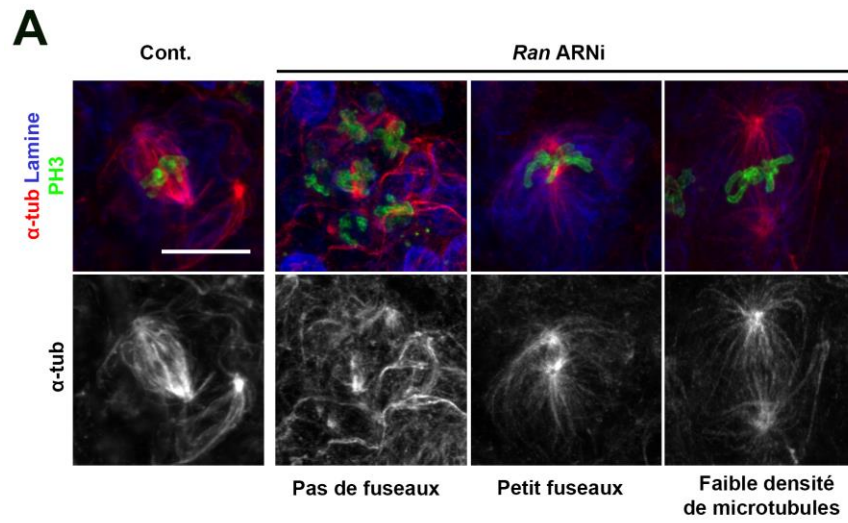
**Figure S3**



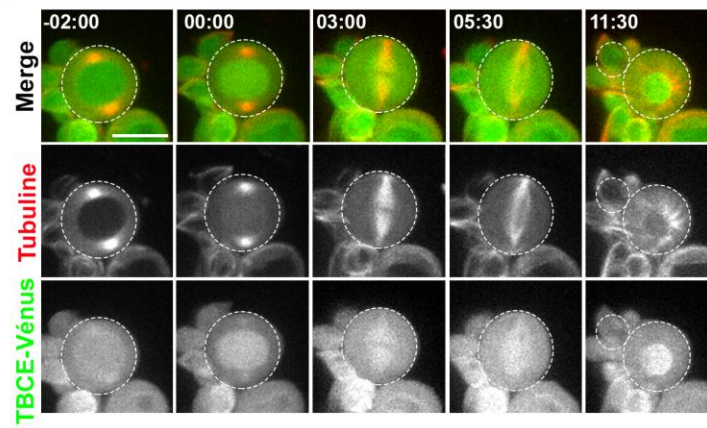
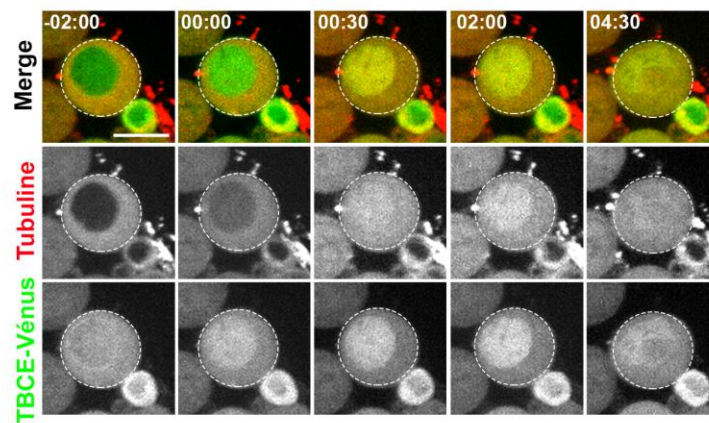
**Figure S4**

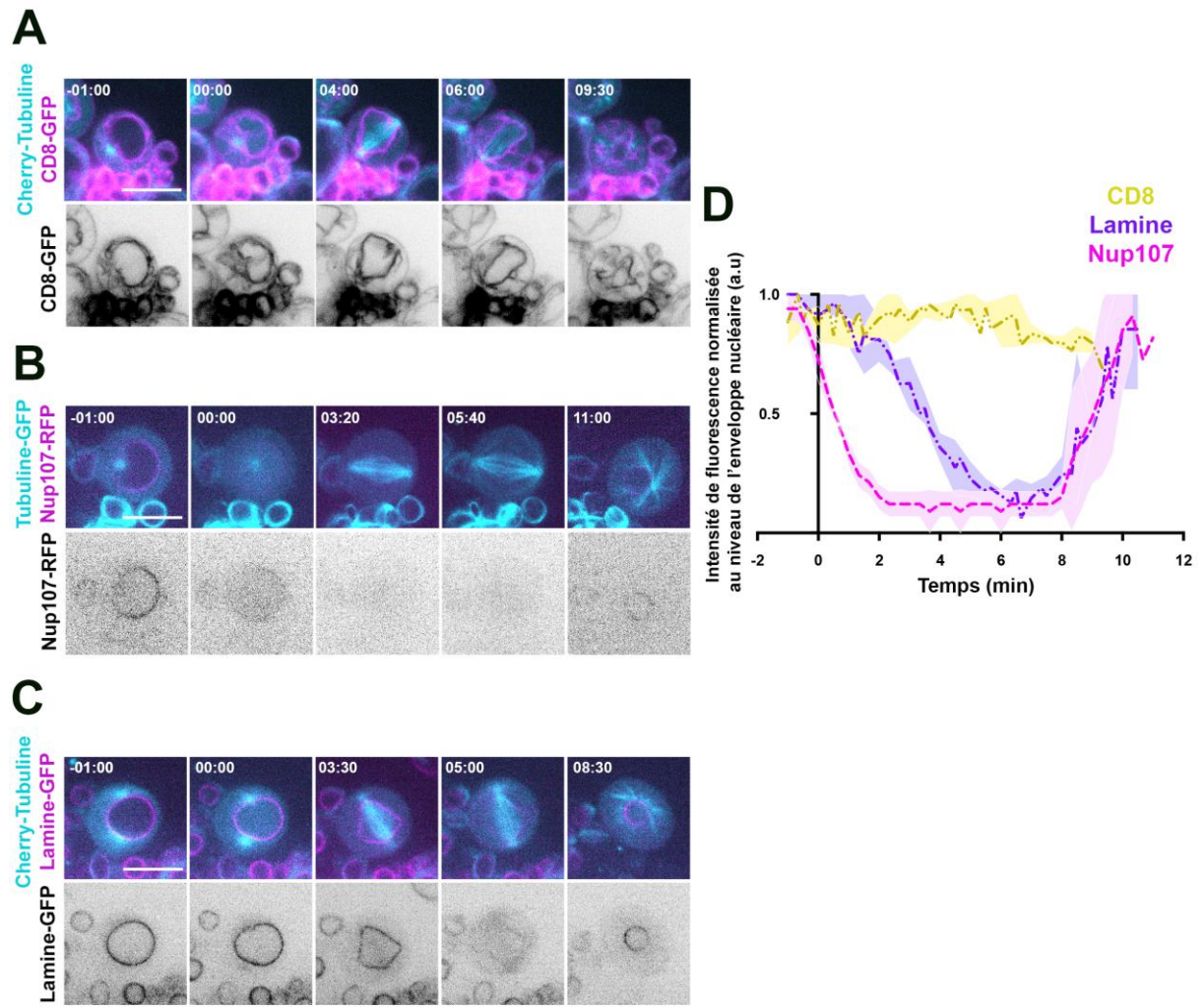


**Figure S5**



**Figure S6**

**A****B****Figure S7**



**Figure S8**



## II. Étude des fonctions des domaines d'Ensconsine dans les Nbs et les ovocytes de drosophiles

### II.A Introduction

Ensconsine (aussi connue sous le nom de E-MAP115 ou MAP7), a été identifiée pour la première fois dans des cellules épithéliales humaines en culture (Masson and Kries, 1993). Le verbe anglais « to ensconse » peut être traduit par bien se caler. Cette protéine interagit avec les microtubules via sa partie N-ter qui présente un domaine de liaison aux microtubules (MBD : Microtubule Binding Domain) (Bulinski et al., 1994). Cependant, la fonction d'Ensconsine restait toujours non résolue jusqu'à ces dernières années. Il a fallu attendre un crible de gènes impliqués dans le développement de l'ovocyte de drosophile pour découvrir sa fonction principale. En effet, les drosophiles femelles mutantes pour Ensconsine (*ensc*) sont stériles et les déterminants de polarité tel que Oskar, Staufen et Gurken (essentiels pour le développement de l'embryon) sont délocalisés dans la chambre ovarienne (Sung et al., 2008). Tous ces phénotypes ont été précédemment observés dans des mutants KHC (Kinesin Heavy Chain) (Januschke et al., 2002). *In vitro*, dans des extraits d'ovocytes mutants *ensc*, les auteurs ont observé une diminution du recrutement de la kinésine-1 sur les microtubules (Sung et al., 2008). De plus, il a été montré *in vitro*, que l'ajout d'Ensconsine purifiée stimule le recrutement de la kinésine-1 sur les microtubules (Monroy et al., 2018). L'ensemble de ces résultats ont défini un modèle dans lequel Ensconsine est essentielle pour recruter la kinésine-1 sur les microtubules. Cette fonction d'Ensconsine a été confirmée dans les cellules musculaires de l'embryon de drosophile et de souris (Metzger et al., 2012). Dans ce contexte cellulaire le recrutement de la kinésine-1 sur les microtubules par Ensconsine est essentielle afin de permettre le positionnement des noyaux au sein des cellules musculaires. De plus dans cette étude, les auteurs ont déterminé que le domaine C-ter d'Ensconsine appelé KBD (Kinesin Binding Domain) permet l'interaction avec la Kinésine-1. La création d'une protéine chimérique constituée de la partie N-ter de la kinésine-1 (domaine moteur de la kinésine-1) et le domaine MBD d'Ensconsine est capable de sauver les défauts de positionnement des noyaux après la déplétion d'Ensconsine. Par conséquent, ces données suggèrent un modèle simple où Ensconsine permet le recrutement de la kinésine-1 sur les microtubules via ces deux domaines MBD

et KBD (Metzer et al., 2012; Sung et al., 2008). Cependant, une autre étude effectuée dans des cellules S2 de drosophile propose un second modèle dans lequel le domaine KBD à lui seul est suffisant pour recruter la kinésine-1 sur les microtubules (Barlan et al., 2013). L'équipe a précédemment montré un rôle d'Ensconsine dans l'assemblage du fuseau mitotique (Gallaud et al., 2014). Cette étude a mis en évidence que cette MAP est impliquée dans deux processus distincts. Ensconsine favorise la polymérisation des microtubules (contrôle de la longueur du fuseau) et permet de séparer les centrosomes en interphase. Dans les mutants *ensc*, on peut observer une diminution de la longueur du fuseau mitotique qui est indépendante de la kinésine-1. En revanche, la séparation des centrosomes est un processus cellulaire qui nécessite le recrutement de la kinésine-1 sur les microtubules par Ensconsine. C'est pourquoi l'équipe a généré des lignées de drosophiles exprimant des transgènes des domaines correspondant aux MBD et KBD d'Ensconsine couplés à la GFP afin de voir l'impact de ces transgènes (dans un mutant *ensc*) sur la longueur du fuseau mitotique ainsi que la séparation des centrosomes. La possibilité que ces différents transgènes sauvent une des fonctions dans un mutant *ensc*, nous permettrait d'obtenir des lignées de séparation de fonctions.

## II.B Récapitulatifs des résultats

- Le domaine MBD n'a aucun effet sur les différents phénotypes
- Le domaine KDB sauve la semi-létalité et les défauts de séparation des centrosomes dans les neuroblastes des mutants *ensc*.
- Le domaine KDB n'est pas suffisant pour sauver le transport vésiculaire et la polarisation de l'ovocytes des mutants *ensc*.
- Le domaine KDB, bien que n'ayant pas d'affinité pour les microtubules permet d'augmenter le recrutement de la kinésine-1 sur les microtubules *in vivo* et *in vitro*.

L'ensemble de ces résultats montrent une double régulation du recrutement de la kinésine-1 sur les microtubules par Ensconsine. En effet, le KBD est un domaine qui augmente l'affinité de la kinésine-1 pour les microtubules et le MBD permet un recrutement optimal sur ceux-ci.

RESEARCH ARTICLE

# Dual control of Kinesin-1 recruitment to microtubules by Ensconsin in *Drosophila* neuroblasts and oocytes

Mathieu Métivier<sup>1</sup>, Brigitte Y. Monroy<sup>3</sup>, Emmanuel Gallaud<sup>1</sup>, Renaud Caous<sup>1</sup>, Aude Pascal<sup>1</sup>, Laurent Richard-Parpaillon<sup>1</sup>, Antoine Guichet<sup>2</sup>, Kassandra M. Ori-McKenney<sup>3</sup> and Régis Giet<sup>1,\*</sup>

## ABSTRACT

*Drosophila* Ensconsin (also known as MAP7) controls spindle length, centrosome separation in brain neuroblasts (NBs) and asymmetric transport in oocytes. The control of spindle length by Ensconsin is Kinesin-1 independent but centrosome separation and oocyte transport require targeting of Kinesin-1 to microtubules by Ensconsin. However, the molecular mechanism used for this targeting remains unclear. Ensconsin contains a microtubule (MT)-binding domain (MBD) and a Kinesin-binding domain (KBD). Rescue experiments show that only full-length Ensconsin restores the spindle length phenotype. KBD expression rescues *ensc* centrosome separation defects in NBs, but not the fast oocyte streaming and the localization of Staufén and Gurken. Interestingly, the KBD can stimulate Kinesin-1 targeting to MTs *in vivo* and *in vitro*. We propose that a KBD and Kinesin-1 complex is a minimal activation module that increases Kinesin-1 affinity for MTs. Addition of the MBD present in full-length Ensconsin allows this process to occur directly on the MT and triggers higher Kinesin-1 targeting. This dual regulation by Ensconsin is essential for optimal Kinesin-1 targeting to MTs in oocytes, but not in NBs, illustrating the importance of adapting Kinesin-1 recruitment to different biological contexts.

**KEY WORDS:** Ensconsin, Kinesin-1, Microtubule, *Drosophila*, Neuroblast, Oocyte

## INTRODUCTION

Microtubules (MTs) are dynamic polymers that grow and shrink over time, a process known as dynamic instability (Mitchison and Kirschner, 1984). They are regulated by microtubule-associated proteins (MAPs), which have a wide range of activities. MAPs can modify microtubule dynamic parameters, and are able to organize microtubules into complex structures. The MAP family also includes microtubule motors that slide along the MTs. These motor proteins use ATP hydrolysis to move cargo along microtubules, thus transporting vesicles, chromosomes, proteins, RNA and even other microtubules. MT networks and their associated MAPs therefore play key roles in various biological processes, including cell division, intracellular trafficking and cell morphogenesis (Barlan and Gelfand, 2017; Heald and Khodjakov, 2015; Walczak and Heald, 2008).

<sup>1</sup>Univ. Rennes, CNRS, IGDR (Institut de Génétique et Développement de Rennes) - UMR 6290, F-35000 Rennes, France. <sup>2</sup>Institut Jacques Monod-Université Paris Diderot-Paris 7, 15 rue Hélène Brion, 75205 Paris Cedex 13, France. <sup>3</sup>University of California, Davis, One Shields Avenue, Davis, CA 95616, USA.

\*Author for correspondence (regis.giet@univ-rennes1.fr)

© A.G., 0000-0001-7216-1944; K.M.O., 0000-0003-2051-2495; R.G., 0000-0001-9027-5849

Received 6 September 2018; Accepted 25 March 2019

Ensconsin (also known as MAP7) was first identified in microtubule preparations isolated from epithelial cells (Bulinski and Bossler, 1994). The protein has been given several names, including epithelial MAP of 115 kDa (E-MAP115) and Ensconsin, owing to its tenacious association with microtubules both *in vivo* and *in vitro* (Bulinski and Bossler, 1994). Ensconsin is associated with the interphase microtubule cytoskeleton, but its overexpression in cultured cells does not seem to affect microtubule dynamics during interphase, and instead mitotic abnormalities frequently occur during cell division (Faire et al., 1999).

The possible function of Ensconsin remained elusive for a decade, until *ensc* mutant flies were isolated in a screen for genes affecting *Drosophila* female germline development. *ensc* mutant females are sterile, and oocytes display microtubule-dependent mislocalization of several polarized key molecules required for the proper patterning of developing embryos. These molecules include *oskar* mRNA and its binding partner, the Staufén adaptor protein, on the posterior side (Ferrandon et al., 1994; St Johnston et al., 1991; Sung et al., 2008), and the Gurken protein, a TGF $\beta$ -like ligand, on the dorso-ventral axis (Neuman-Silberberg and Schupbach, 1993; Sung et al., 2008). The *ensc* mutant oocytes also show absent microtubule-dependent streaming of granules (Sung et al., 2008). Interestingly, these defects are shared by Kinesin heavy chain (KHC) mutants (Brendza et al., 2000, 2002; Duncan and Warrior, 2002; Januschke et al., 2002). In *ensc* oocyte extracts, the recruitment of Kinesin-1 motors to MTs is impaired *in vitro*, and it has recently been shown that purified Ensconsin proteins can directly recruit Kinesin-1 to the MT *in vitro*, providing evidence for a model in which Ensconsin stimulates recruitment of Kinesin-1 to MTs (Sung et al., 2008). This recruitment model is also evident in mouse and *Drosophila* muscle cells. In these large cells, both Ensconsin and Kinesin-1 are required to promote nuclei positioning and spacing, processes that are required for correct muscle function. In this study, the authors also showed a direct physical association between the Kinesin-1 motor and the Ensconsin C-terminal domain (the Kinesin-binding domain, or KBD). Furthermore, after Kinesin-1 or Ensconsin knockdown, a fusion between the Ensconsin N-terminal MT-binding domain (MBD) and the Kinesin-1 motor domain is sufficient to rescue nucleus-positioning defects (Metzger et al., 2012). Together, the studies of muscle cells and fly oocytes cited here support a model in which Ensconsin favours Kinesin-1 microtubule recruitment via its MBD and KBD domains (Metzger et al., 2012; Sung et al., 2008). However, a second model, based on S2 cultured cell studies, proposes that some Ensconsin function does not depend on the MBD. For these functions, Kinesin-1 can be recruited solely by the KBD (Barlan et al., 2013), showing that microtubule targeting by Ensconsin is not an absolute requirement for Kinesin-1 function. Here, we have used a combination of genetic studies with rescue constructs at different stages of fly development, as well as *in vitro* experiments, to unambiguously show that

Kinesin-1 is actually subjected to dual recruitment by Enscinsin that synergizes its loading onto microtubules.

## RESULTS

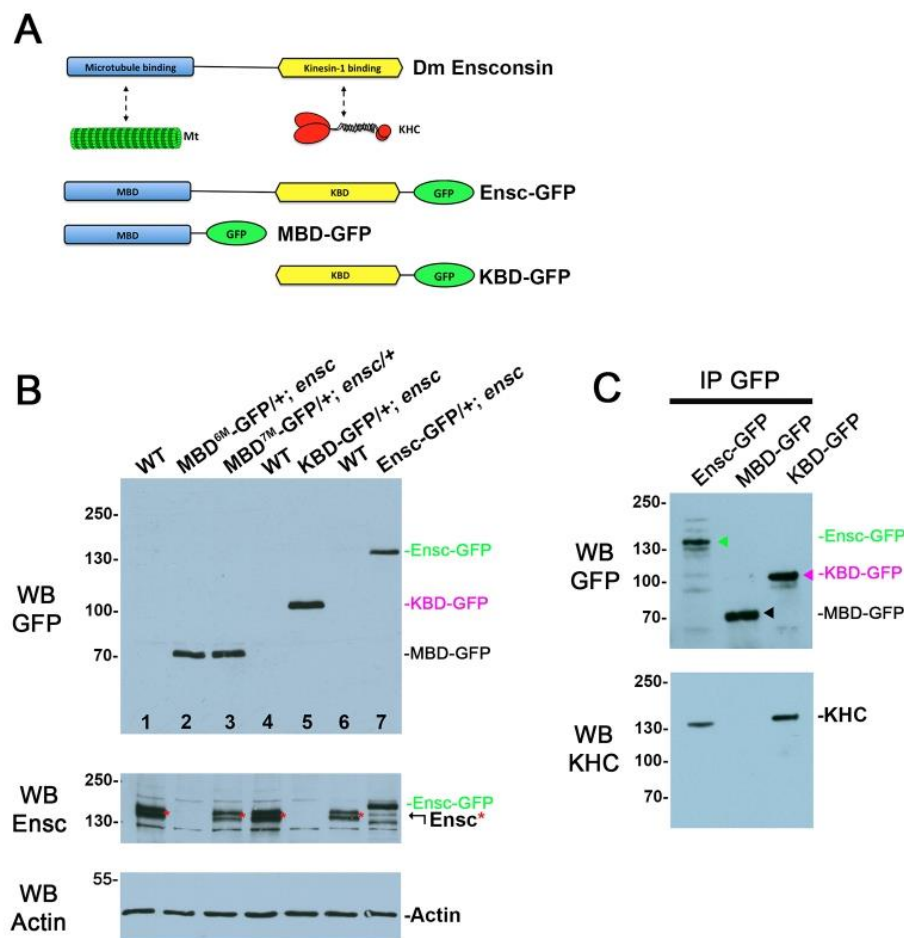
### *In vivo* functional analysis of the different domains of Enscinsin

A previous study identified two Enscinsin deletion mutants, named *ensc* $\Delta$ Null and *ensc* $\Delta$ N, expressing, respectively, no protein or with the C-terminal Kinesin-binding domain intact (Sung et al., 2008). However, western blotting analyses showed that these two mutants do not express detectable Enscinsin protein or truncated products, and are therefore null alleles (see Materials and Methods for details, and Gallaud et al., 2014). To investigate the roles of the Enscinsin functional domains (microtubule binding and kinesin binding), we generated several fly lines. These expressed full-length Ensc-GFP, Ensc-MBD-GFP or Ensc-KBD-GFP, under the control of the polyubiquitin promoter. These lines were then used for rescue experiments in *ensc* mutant flies (Fig. 1A, and Materials and Methods). We used western blots to monitor the expression of the GFP-tagged Enscinsin variants in brain extracts. The exogenous full-length Ensc-GFP appeared as a 150 kDa doublet in western blots, and it was expressed at levels similar to those of endogenous Enscinsin (Fig. 1B, middle panel, lanes 6 and 7). The MBD-GFP (Fig. 1B, top panel, lanes 2 and 3) and KBD-GFP (lane 5) proteins, appeared as 70 and 100 kDa bands, respectively, and were expressed at similar levels to Ensc-GFP (lane 7). In *ensc* mutant flies, Ensc-

GFP expression rescued the partial lethality and restored female fertility. However, the expression of MBD-GFP, as tested in three independent transgenic lines, failed to do so. In contrast, in two independent lines, KBD-GFP expression in *ensc*-null mutant flies rescued the partial lethality as much as wild-type Ensc-GFP, which suggests that this domain is sufficient for fly development into adulthood. However, we noticed that the Ensc-KBD female flies remained sterile, suggesting that the KBD alone is not enough to fully restore some aspects of oocyte development. To show that Enscinsin was able to physically interact with Kinesin-1, we performed immunoprecipitation experiments using whole female fly extracts expressing the GFP-tagged proteins (see Materials and Methods, and Fig. 1C, top panel). We found that both Ensc-GFP and KBD-GFP, but not MBD-GFP, proteins were able to interact with KHC (Fig. 1C, bottom panel), similarly to vertebrate Enscinsin (MAP7) (Hooikaas et al., 2019; Metzger et al., 2012).

### The Enscinsin KBD fully rescues Kinesin-dependent centrosome separation defects in fly neuroblasts

A previous study has shown that Enscinsin stimulates microtubule growth during mitosis. Consequently, *ensc* mitotic spindles are 20% shorter than their wild-type counterparts in neural stem cells (neuroblasts, NBs) (Gallaud et al., 2014). In addition, overexpression of Enscinsin (Ensc OE) in brain neuroblasts triggers the formation of longer and bent mitotic spindles (Fig. S1). The fly NB divides asymmetrically to generate a renewing NB and a



**Fig. 1. Schematic diagram and expression of GFP-tagged Enscinsin variants.** (A) Endogenous Enscinsin harbours an N-terminal MT-binding domain (MTB, blue) and a C-terminal Kinesin-binding domain (KBD, yellow). The three protein variants were tagged with GFP and expressed in *ensc*-null flies using a polyubiquitin promoter. (B) Western blot analysis of different GFP-tagged Enscinsin variants from brain tissue. The whole membrane was probed with GFP antibodies for western blotting (top). The same membrane was subsequently stripped (see Materials and Methods) to reveal endogenous Enscinsin (red asterisks) and an Actin loading control (bottom). WT, control brain tissue (lanes 1, 4, 6). The expression of the transgenes is shown in *ensc*-null individuals (lanes 2, 5, 7), except in lane 3, where a MBD-GFP line is examined in hemizygous *ensc* tissue. The endogenous Enscinsin band/doublet is indicated with a red asterisk (middle panel). (C) Whole-fly extracts were prepared and subjected to immunoprecipitation using GFP-TRAP beads (see Materials and Methods). The beads were then analysed by western blotting and probed using anti-GFP (top) or anti-KHC (bottom) antibodies. The positions of MBD-GFP, KBD-GFP and Ensc-GFP are indicated on the right with black, pink and green arrowheads, respectively. KHC is present in Ensc-GFP and KBD-GFP but not in MBD-GFP immunoprecipitates.

smaller cell subjected to differentiation. In this cell type, centrosome separation is initiated after the mother centrosome loses its MT nucleation potential. As a consequence, it is inherited in the differentiating cell, while the new centrosome retains MT nucleation and stays in the renewing NB (Conduit and Raff, 2010; Gallaud et al., 2014; Januschke et al., 2011; Rebollo et al., 2007; Rusan and Peifer, 2007). Ensconsin and Kinesin-1 are both required during interphase to promote centrosome separation in NBs. In *ensc* and *khc<sup>27/khc<sup>63</sup></sup>* hypomorphic mutants, the centrosome separation does not occur after cytokinesis, but instead just before mitosis, leading to frequent mis-segregation of mother and daughter centrosomes (Gallaud et al., 2014). To challenge for a possible cooperation between Ensconsin and Kinesin-1, we analysed centrosome separation in *khc<sup>27/khc<sup>63</sup></sup>* hypomorphic NBs after Ensc OE. We found Ensc OE completely rescued the centrosome separation defects in *khc* mutant neuroblasts, indicating that Ensc OE was able to boost the low Kinesin-1 activity of this hypomorphic *khc<sup>27/khc<sup>63</sup></sup>* mutant. By contrast, *khc* mutations did not trigger spindle shortening of the long and bent spindles obtained following Ensc OE, in agreement with the fact that the regulation of the NB spindle length is a Kinesin-1 independent process (Gallaud et al., 2014, Fig. S1A-D and Movies 1-4). Importantly, KHC protein levels were normal in *ensc* mutants, and vice versa, indicating that the stability of one protein was independent upon the presence of the other (Fig. S1F). In addition, Ensconsin-Venus and endogenous Ensconsin localization (Fig. S1G,E) were not affected in a *khc* background. This indicates that Ensconsin protein stability and Ensconsin localization are Kinesin-1 independent, but that Ensconsin OE can stimulate low Kinesin-1 activity.

In parallel, we measured the angles between the two centrosomes shortly before the nuclear envelope breakdown (NEBD), as a readout of centrosome separation. In agreement with cooperation between Kinesin-1 and Ensconsin during interphase, we found that elevating the levels of Ensconsin protein (Ensconsin Overexpression: Ensc OE) completely rescued the centrosome separation defects in *khc* mutant neuroblasts, indicating that Ensc OE was able to boost the low Kinesin-1 activity of *khc<sup>27/Khc<sup>63</sup></sup>* mutant. By contrast, *khc* mutations did not trigger spindle shortening of the long and bent spindles obtained following Ensc OE, in agreement with previous observations indicating that spindle length is independent of Kinesin-1 activity (Gallaud et al., 2014, Fig. S1A-D and Movies 1-4).

We then monitored the ability of GFP-tagged Ensconsin variants to rescue spindle length and centrosome separation defects observed in *ensc* mutants. To do this, we used live microscopy on Ensc-GFP, KBD-GFP and MBD-GFP variants co-expressing RFP-tubulin. In control NBs (Fig. 2A,F-H, Movie 5), the centrosomes were fully separated before NEBD, as the angle between the two centrosomes and the nucleus centre was between 120 and 180° (100%, *n*=30). In *ensc* mutants (Fig. 2B,F-H, Movie 6), most cells displayed incomplete centrosome separation before mitosis, as most of the angles between the two centrosomes and the nucleus centre were between 60 and 120° (61.9%, *n*=21), but this defect was restored by Ensc-GFP expression, after which 100% (*n*=19) of the NBs showed pre-NEBD centrosome separation that was comparable with the control (Fig. 2C,G,H, Movie 9). *ensc* mutant NBs expressing MBD-GFP showed centrosome separation defects similar to those of the *ensc* mutants (58.8% between 60 and 120°, *n*=17, Fig. 2D,F-H, Movie 7). In *ensc* mutant NBs expressing KBD-GFP, centrosome separation was restored (87% above 120°, *n*=23), suggesting that this domain can efficiently rescue the centrosome separation defects on its own (Fig. 2E,F-H, Movie 8). Interestingly, this rescue of the

centrosome-separation defect did not require microtubule binding, as the KBD was not detected on MTs in squashed preparations (Fig. 2E, middle panels).

Efficient mitotic spindle assembly was assayed using spindle length measurements. Ensc variant rescue of mitotic spindle length associated with Ensconsin deletion indicated that only Ensc-GFP, and not Ensc-KBD or Ensc-MBD, was able to restore normal spindle size. This demonstrates that mitotic spindle length control in neuroblasts requires full-length Ensconsin, and that MBD-GFP and KBD-GFP are unable to restore correct spindle length individually (Fig. 2I and Movies 5-9).

### The Ensconsin KBD is not sufficient for ooplasmic streaming and the correct targeting of Staufer and Gurken in the oocyte

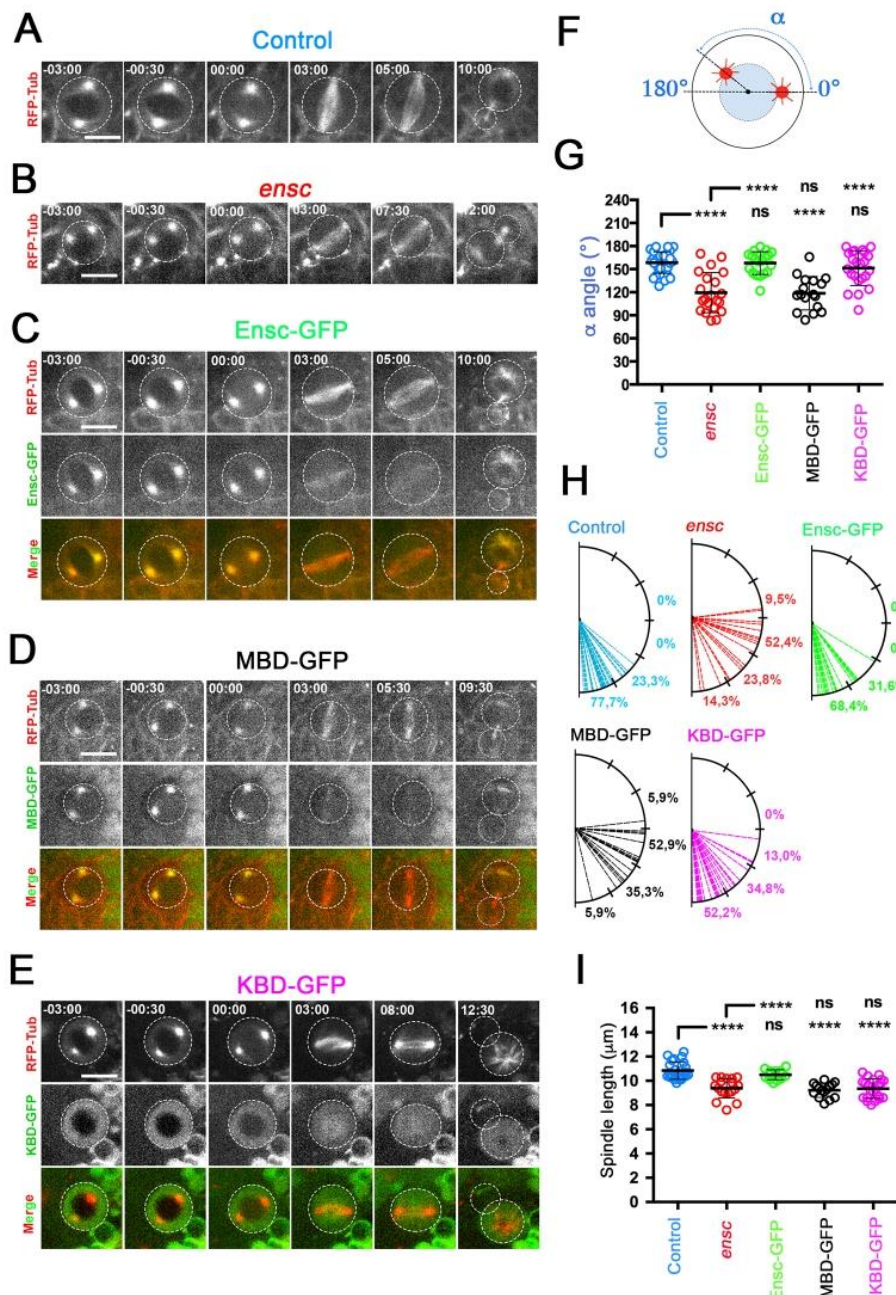
A previous study has shown that Ensconsin is required for Staufer and Gurken transport in the oocyte to the posterior and the antero-dorsal regions, respectively (Sung et al., 2008).

We first checked that the MBP-GFP, KBD-GFP and Ensc-GFP proteins were expressed in oocytes using live immunofluorescence analyses and western blotting of oocyte extracts (see Materials and Methods for details and Fig. S4A,B).

We then monitored the localization of Gurken in *ensc* mutant oocytes expressing Ensc-GFP, KBD-GFP or MBD-GFP at stages 9 (Fig. S2). In most wild-type (71%, *n*=14) and Ensc-GFP oocytes (72%, *n*=18), Gurken was tightly localized at the cortical antero-lateral corner (Fig. S2A, top, Fig. S2C). By contrast, the majority of, *ensc* (70% *n*=23) and Ensc-MBD (81%, *n*=15) oocytes contained Gurken protein in a punctiform pattern spread around the nuclear region (Fig. S2A, bottom panels, Fig. S2B,C). KBD-GFP oocytes had an intermediate phenotype and half of these oocytes showed abnormal or incomplete Gurken localization (52%, *n*=12/23, Fig. S2).

At the same time, we also monitored the localization of Staufer at the posterior cell cortex (Fig. 3). During oogenesis, two Kinesin-1-dependent pathways are used to transport Staufer particles to the posterior pole of the embryo, where Myosin V captures them. At stage 9, Staufer is transported directly by Kinesin-1 through the network of polarized microtubules, the plus ends of which are directed towards the posterior cortex (Fig. 3D, top left see also Lu et al., 2018, 2016). At stage 10B, Staufer particles are transported via ooplasmic streaming: a fast and important movement of particles on mobile microtubules that slide on a population of stable microtubules that are anchored to the cortex of the ovarian chamber (Lu et al., 2018, 2016).

At stage 9, we found that Ensc-GFP (Fig. 3Ae, *n*=9) was able to fully rescue the cortical posterior localization of Staufer similar to the controls (Fig. 3Aa, *n*=13). In contrast, both in *ensc* (Fig. 3Ac, *n*=5) mutant oocytes and in those in which MBD-GFP was expressed (Fig. 3Ag, *n*=8), Staufer displayed a crescent intensity that was about five times weaker than that of wild type (Fig. 3B). Expression of KBD in *ensc* mutant oocytes (*n*=17) allows Staufer to be targeted to the posterior pole in stage 9 oocytes, and the crescent intensities reached 74% of the control values, although the protein appeared mislocalized in some case (Fig. 3Ai, red arrow, Fig. 3B). At stage 10B, Ensc-GFP (*n*=13) and wild-type (*n*=15) oocytes showed a normal Staufer crescent at the posterior pole (Fig. 3A, compare b with f), whereas the intensity was weak in *ensc* (Fig. 3Ad, *n*=11) and MBD oocytes (Fig. 3Ah, *n*=9). KBD oocytes (Fig. 3J, *n*=14) showed an intermediate phenotype and the Staufer crescent intensity was 50% of the value observed in controls (Fig. 3Aj and Fig. 3C). Because Kinesin-1-dependent ooplasmic streaming participates in Staufer targeting to the posterior cortex in stage 10B oocytes, we



**Fig. 2. Functional analysis of Ensconsin microtubule- and kinesin-binding domains during cell division.** (A,B)

Selected frames of a control NB (A) and a mutant *ensc* NB (B) expressing RFP-tubulin during cell division. Thirty seconds before the nuclear envelope breakdown (NEBD), the centrosomes are already fully separated and well positioned in wild-type cells, but not in *ensc*. (C) An *ensc* mutant NB expressing Ens-GFP during cell division. In the merged images in C-E, RFP-tubulin (RFP-Tub) is red and GFP-tagged proteins are green, whereas they are both monochrome in the top and middle panels, respectively. (D) *ensc* mutant NBs expressing MBD-GFP during cell division. Here, the centrosomes are incompletely separated before NEBD. (E) An *ensc* mutant NB expressing KBD-GFP during cell division. This particular cell was isolated from flattened brains in PBS to reveal that KBD-GFP does not colocalize with the MT cytoskeleton. The centrosome separation defect is fully restored. Scale bars: 10  $\mu\text{m}$ . (F) Scheme showing the  $\alpha$  angle measurement, reflecting centrosome separation for the indicated genotypes (see Materials and Methods). (G) Box plot showing the mean centrosome separation  $\alpha$  angle ( $\pm$ s.d.) for control ( $158.5 \pm 14.0^{\circ}$ ,  $n=30$ ), *ensc* ( $119.4 \pm 26.0^{\circ}$ ,  $n=21$ ), Ens-GFP ( $157.9 \pm 14.9^{\circ}$ ,  $n=19$ ), MBD-GFP ( $118.6 \pm 21.8^{\circ}$ ,  $n=12$ ) and KBD-GFP ( $151.3 \pm 22.6^{\circ}$ ,  $n=23$ ) NBs. (H) Representation of the  $\alpha$  angle distributions of the NBs shown in G. (I) Box plot showing the mean mitotic spindle length ( $\pm$ s.d.) for control ( $10.9 \pm 0.7 \mu\text{m}$ ,  $n=24$ ), *ensc* ( $9.4 \pm 0.8 \mu\text{m}$ ,  $n=18$ ), Ens-GFP ( $10.5 \pm 0.4 \mu\text{m}$ ,  $n=13$ ), MBD-GFP ( $9.2 \pm 0.6 \mu\text{m}$ ,  $n=12$ ) and KBD-GFP ( $9.3 \pm 0.8 \mu\text{m}$ ,  $n=22$ ) NBs. \*\*\*\* $P < 0.0001$  (Wilcoxon test); ns, not significant.

monitored the ability of our different Ensconsin variants to restore this process (Palacios and St Johnston, 2002; Serbus et al., 2005; Sung et al., 2008) (Fig. 3E,F). We found, as described previously (Sung et al., 2008), that *ensc* oocytes ( $n=15$ ) showed no ooplasmic streaming, as did MBD-expressing oocytes ( $n=13$ , Fig. 3F,G). However, expression of Ens-GFP ( $n=16$ ) efficiently restored ooplasmic particle velocity ( $n=11$  oocytes, 123 nm/sec, Fig. 3F-G). KBD-GFP-expressing oocytes showed a complete absence ( $n=17/23$ ) or a very slow ( $n=6/23$ ) ooplasmic streaming ( $n=6/23$  oocytes, 10 nm/s). To summarize, our data show that Ensconsin KBD is able to sustain efficient Staufen targeting during stage 9 of oogenesis but it but fails to promote ooplasmic streaming and consequently the next step of Staufen polarization during stage 10B.

### The Ensconsin KBD promotes minimal recruitment of Kinesin-1 on the oocyte MT network

Kinesin-1 can bind to Ensconsin, and the correct targeting/loading of this motor on MTs is essential for Kinesin-1 function (Metzger et al., 2012). We confirmed, as described previously (Sung et al., 2008), that endogenous Ensconsin is located in the oocyte egg chamber during early stages of oogenesis and also colocalized with the MT cytoskeleton at stage 9 and 10B (Fig. S4C). We decided to examine the localization of Kinesin-1 in oocytes at stage 9 and 10B, the two developmental stages that require Kinesin-1 for direct transport of Staufen particles to the posterior cortex, and for ooplasmic streaming, respectively. The microtubule network of the egg chamber was challenging to detect because of the high

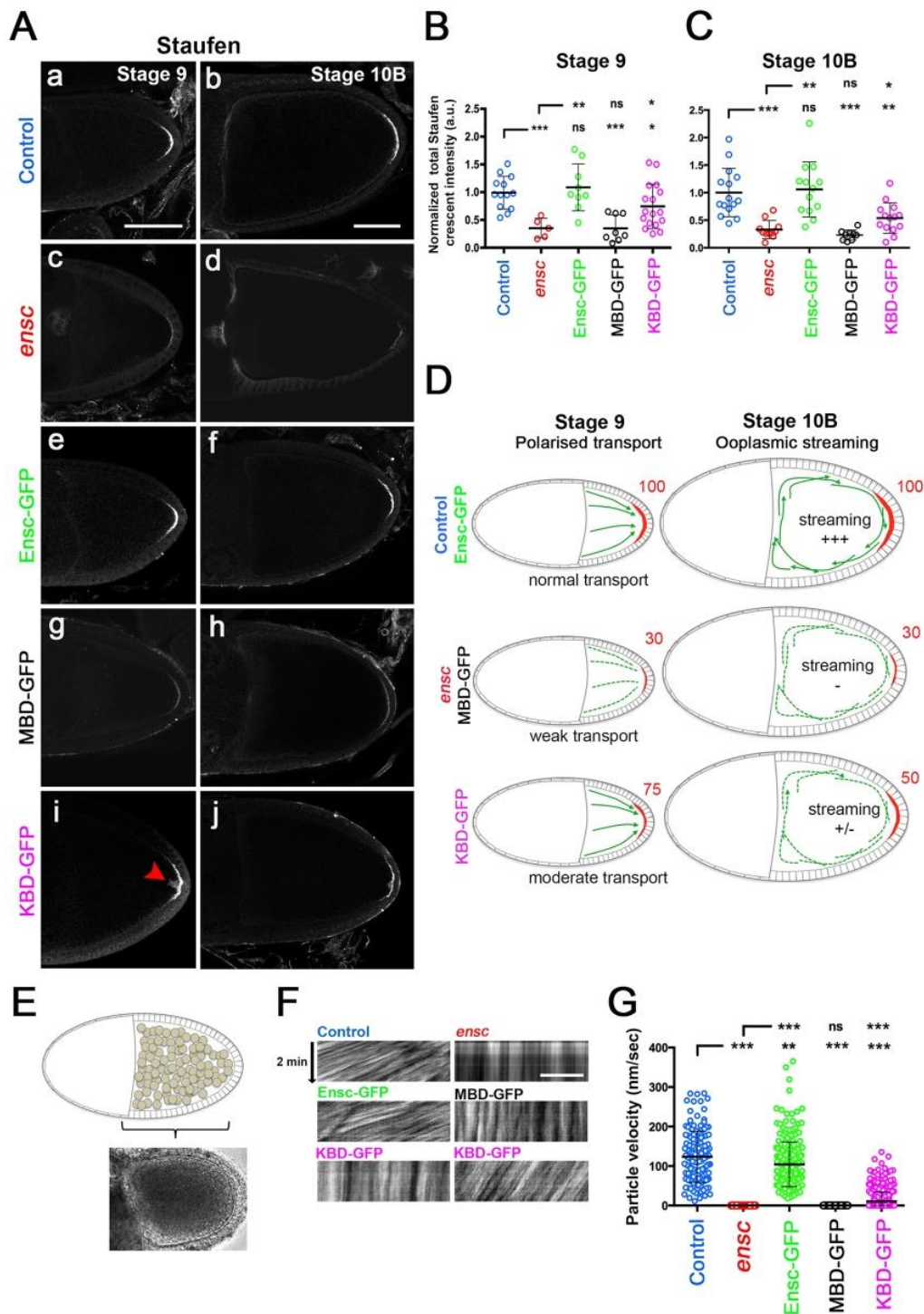


Fig. 3. See next page for legend.

background caused by the presence of free tubulin dimers. Thus, to visualize the microtubule network, as well as MT-associated Kinesin-1 inside the egg chamber, it was necessary to permeabilize the oocyte for 1 h in a MT stabilizing buffer before methanol fixation (Januschke et al., 2006). In control stage 9 oocytes, KHC appeared to be located on the polarized MT network,

but the majority of KHC was located at the posterior pole (Fig. 4A, top). In *ensc* and MBD oocytes (Fig. 4A, second and fourth panels from top), this localization pattern was completely impaired. Interestingly, KHC total protein levels were comparable with control extracts in *ensc* mutants, when analysed by western blot, suggesting that the ability of KHC to bind MTs was impaired

**Fig. 3. The Kinesin-binding domain of Ensconsin is not sufficient to restore the Staufen localization in the oocyte egg chamber and fast oocyte streaming.** (A) Stage 9 control (a), *ensc* (c) and *ensc* mutant fly oocytes expressing full-length Ensconsin-GFP (e), MBD-GFP (g) or KBD-GFP (i) were stained for Staufen. Stage 10B oocytes from the same five genotypes were stained for Staufen (b,d,f,h,j). The red arrowhead in i indicates defective Staufen localization. (B) Box plot showing the quantification of Staufen crescent intensity ( $\pm$ s.d.) during stage 9. Wild type ( $1.0 \pm 0.29$ ,  $n=13$ ), *ensc* ( $0.35 \pm 0.18$ ,  $n=5$ ), Ens-GFP ( $1.08 \pm 0.42$ ,  $n=9$ ), MBD ( $0.35 \pm 0.24$ ,  $n=8$ ) and *ensc*; KBD ( $0.74 \pm 0.40$ ,  $n=17$ ). (C) Box plot showing the quantification of Staufen crescent intensity ( $\pm$ s.d.) at stage 10B. Wild type ( $1.0 \pm 0.44$ ,  $n=15$ ), *ensc* ( $0.33 \pm 0.16$ ,  $n=11$ ), Ens-GFP ( $1.06 \pm 0.50$ ,  $n=13$ ), MBD ( $0.23 \pm 0.09$ ,  $n=9$ ) and KBD ( $0.54 \pm 0.28$ ,  $n=14$ ). (D) Schematic view of Staufen transport to the posterior cortex during stages 9 (left) and 10B (right). The Staufen crescent is displayed in red. The microtubule network (in green) is polarized at stage 9 and the arrows indicate the direction of the MT plus-ends. Dotted green lines indicate altered Kinesin-1 transport. The Kinesin-1-mediated polarized transport of Staufen to the posterior cortex is strongly diminished in MBD and *ensc* oocytes but is fully rescued by expression of Ens-GFP. Expression of KBD is able to rescue 75% of Staufen targeting to the posterior cortex. During stage 10B (top right), a complete reorganization of the MT network occurs. Kinesin-1-mediated MT sliding leads to cytoplasmic mixing of the ooplasm, a process that also contributes to Staufen targeting. Staufen crescent formation is fully rescued by Ens-GFP and moderately impaired in KBD oocytes, while *ensc* and MBD oocytes display a weak Staufen crescent. (E) Scheme of an oocyte (left) and phase-contrast image of a control oocyte egg chamber (right) where particles are visible. (F) Kymographs showing the displacement of particles from different ooplasmic regions for 2 min. Scale bar: 10  $\mu$ m. The genotype is indicated at the top of each image. Control ( $n=11$ , top left panel) and Ens-GFP-expressing ( $n=16$ , middle left panel) oocytes show similar particle velocities. *ensc* oocytes ( $n=15$ , top right panel) and MBD-GFP oocytes ( $n=13$ , middle right panel) do not show any ooplasmic streaming. KBD ( $n=23$ ) oocytes show either absent (17/23, bottom left panel) or slower ooplasmic streaming (6/23, bottom right panel). (G) Scatter dot plot showing the mean particle velocities ( $\pm$ s.d.) of control ( $n=146$ ,  $123 \pm 65$  nm/s), Ens-GFP ( $104 \pm 56$  nm/s,  $n=243$ ), KBD-GFP ( $n=395$ ,  $10 \pm 23$  nm/sec), MBD-GFP (0 nm/sec,  $n=195$ ) or *ensc* (0 nm/sec,  $n=225$ ) ooplasmic. \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.0001$ , Wilcoxon test. ns, not significant.

following loss of Ensconsin but not KHC stability (Fig. 4A-C and Fig. S3A, right panels). In addition and similarly to brain tissues, Ensconsin protein levels, as well as its ability to bind oocyte MTs, was Kinesin-1 independent (Fig. S3A, left panel, Fig. S3B). Expression of Ens-GFP completely rescued the correct localization of KHC localization to the posterior pole and on the MT network (Fig. 4A, third panels). Interestingly, at the corresponding stage 9, KHC was present on the MT network and 50% of the pool of KHC appeared to be targeted to the posterior cortex in KBD-GFP oocytes (Fig. 4A, bottom panels Fig. 4B).

In wild-type stage 10B oocytes ( $n=10$ ), Kinesin-1 heavy chain (KHC) was strongly bound to the internal oocyte MT network used for the process of oocyte streaming, similar to previous observations (Januschke et al., 2006) (Fig. 4C, top panels). On the other hand, KHC localization was absent on the MT network of *ensc* oocytes ( $n=7$ , Fig. 4, second panels from top). This localization was fully restored by the expression of Ens-GFP ( $n=15$ , Fig. 4, third panels from top), but not by MBD-GFP ( $n=13$  Fig. 4, fourth panels from top). In KBD-GFP-expressing oocytes ( $n=9$ ), the MT network showed a very weak presence of Kinesin-1 (Fig. 4, bottom panels). In most cases, KHC appeared to aggregate around the MT network of these KBD oocytes rather to colocalize with MT bundles (Fig. 4, purple arrows). Altogether, these results suggest that KBD is sufficient to fully rescue centrosome-separation defects in brain NBs (Fig. 2) and to recruit Kinesin-1 in stage 9 but not in stage 10B oocytes. Interestingly, and similar to previous observations, the cytoplasmic arrays of MT bundles in stage 10B oocytes was severely disrupted following *khc* RNAi (Fig. S3B; Lu et al., 2016;

Serbus et al., 2005). This was also the case when KHC was not targeted to the MTs by Ensconsin in stage 10B oocytes (Fig. 4C, in *ensc*, MBD and KBD oocytes). To conclude, the presence of Kinesin-1 and also its MT targeting by Ensconsin are required to promote MT bundling and organization, and ultimately oocyte streaming during stage 10B of oogenesis.

### The Ensconsin KBD recruits Kinesin-1 to MTs *in vitro*

To assess whether the KBD recruits Kinesin-1 to MTs directly, we used an *in vitro* approach with purified components (Fig. 5B). We performed a co-sedimentation assay with purified proteins and taxol-stabilized microtubules to analyse the effect of KBD on a truncated *Drosophila* Kinesin-1 protein (K560) recruitment in an excess of MTs (Monroy et al., 2018). Interestingly, under our conditions, we found an enrichment of K560 in the MT pellet in the presence, compared with the absence, of KBD ( $75.1 \pm 7.1$  versus  $46.6 \pm 3.9\%$  of K560 in the MT pellet in the presence versus the absence of KBD, respectively;  $n=3$ ;  $P=0.0037$ ). In addition, we found that KBD was apparent in the MT pellet only in the presence of K560, but not in its absence ( $59.7 \pm 10.6$  versus  $2.0 \pm 1.7\%$  of KBD in the MT pellet in the presence versus the absence of K560, respectively;  $n=3$ ;  $P=0.0007$ ), suggesting these two proteins form a complex that exhibits a higher affinity for MTs. Altogether, our data indicate that KBD is able to recruit enough Kinesin-1 to MTs both *in vitro* and *in vivo*. This recruitment is sufficient to rescue centrosome separation defects in neuroblast, but not to correct transport in oocyte, suggesting that the need for Kinesin-1 recruitment to microtubules depends on the cellular context.

## DISCUSSION

### Full-length Ensconsin is required for maintaining mitotic spindle size

Ensconsin was first discovered two decades ago and was originally purified from microtubule pellets isolated from epithelial cells (Bulinski and Bossler, 1994). Preliminary overexpression experiments did not reveal modified microtubule dynamics in human interphase cells, and *ensc* mutant *Drosophila* oocytes have normal MT cytoskeletons (Faire et al., 1999). However, changes in Ens levels affect spindle morphogenesis in fly neural stem cells and in human cultured cells, preventing spindle defects (Bulinski et al., 2001; Gallaud et al., 2014; McHedlishvili et al., 2018). Fly *ensc* mutant NBs display short spindles and have reduced MT polymerization speeds. In addition, Ensconsin strongly stimulates MT polymerization *in vitro*, and its overexpression increases spindle length (Fig. S1). Rescue experiments indicate that neither the MBD-GFP nor KBD-GFP fusion protein is able to restore spindle length, even when expressed at similar levels to full-length Ensconsin-GFP, which efficiently rescues that phenotype. This reveals that, although it has a functional MT-binding sequence, the MBD is not able to stimulate MT polymerization on its own *in vivo*. Further studies at the molecular level will be needed to investigate how the MBD and KBD domains cooperate to stimulate MT polymerization.

### Mechanisms of Ensconsin stimulation of Kinesin-1 recruitment to MTs

Several studies have shown a functional connection between Kinesin-1 and Ensconsin. First of all, inhibition of Ensconsin and Kinesin-1 has yielded similar phenotypes in four different studies (Barlan et al., 2013; Gallaud et al., 2014; Metzger et al., 2012; Sung et al., 2008). Second, both proteins colocalize on the internal MT

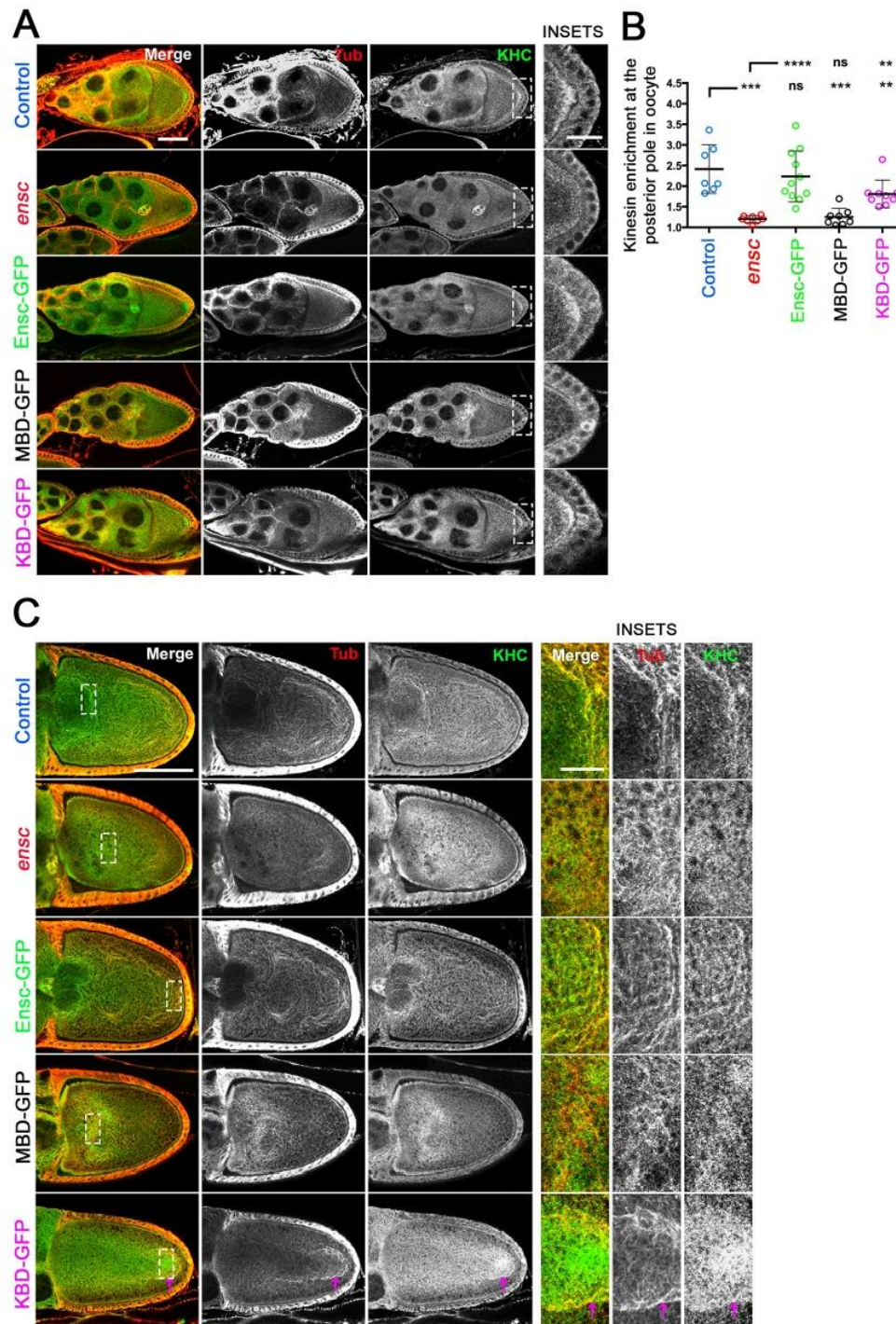


Fig. 4. See next page for legend.

network of *Drosophila* oocyte egg chambers (Sung et al., 2008, this paper). Third, Ensconsin C-terminal domain (KBD) and Kinesin-1 can interact *in vivo* (Hooikaas et al., 2019; Metzger et al., 2012, this study). Based on the current literature, the recruitment model suggests that Ensconsin bound to the MT lattice (via the MBD) serves as a direct recruitment platform for Kinesin-1 (Fig. 5C). This targeting model is supported by Kinesin-1 motor recruitment on

MTs, which is lower in *ensc* oocyte extracts and undetectable in intact *ensc* oocytes (Sung et al., 2008, this study, Fig. 4). Furthermore, in Ensconsin and Kinesin-1 knockdown muscle cells, a fusion protein between the Ensconsin-MBD and the Kinesin-1 motor domain (leading to strong recruitment of the Kinesin motor to the MT network) was able to rescue nuclei spacing, thus strongly supporting the hypothesis that the function of Ensconsin is to deliver

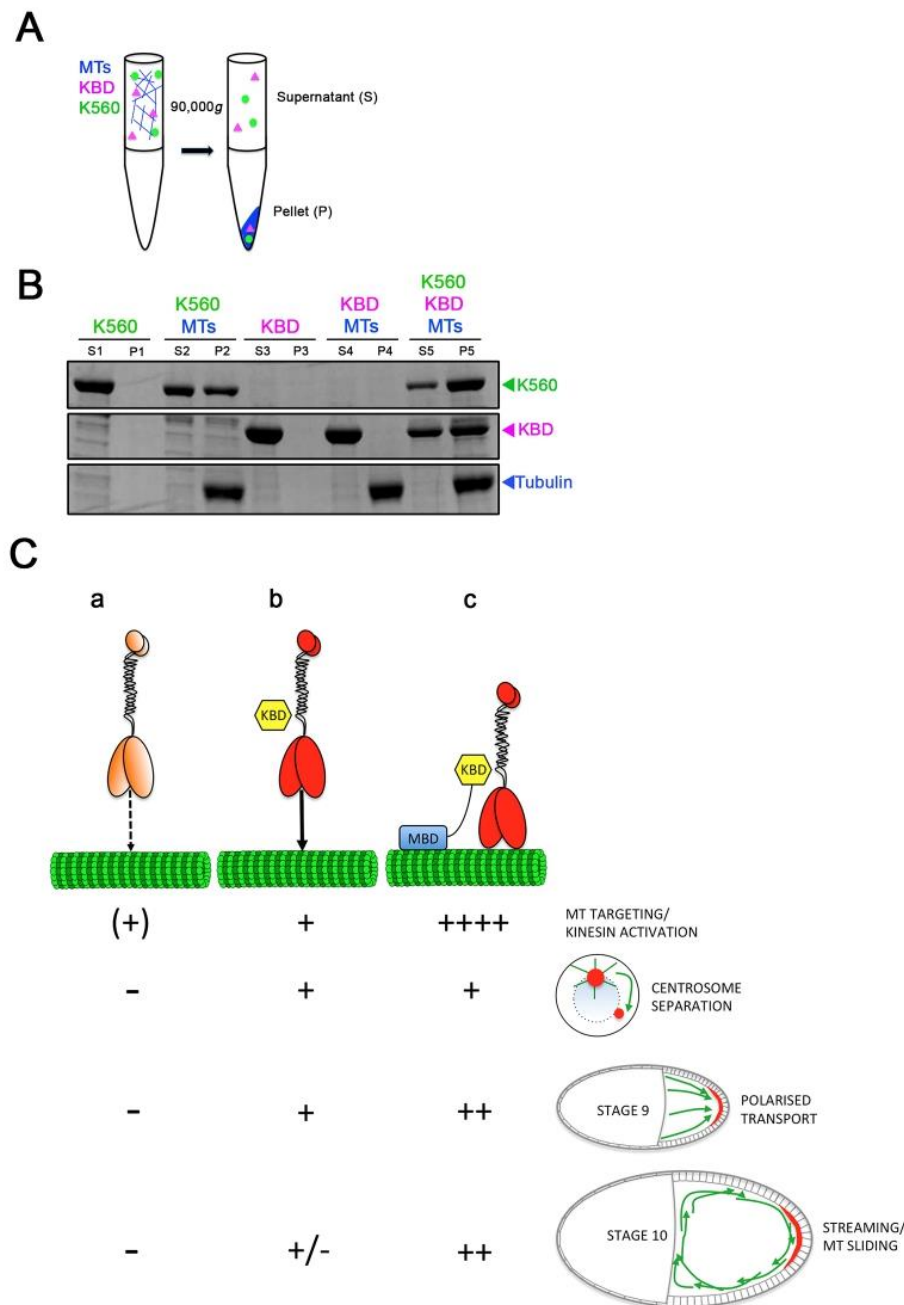
**Fig. 4. The Ensconsin Kinesin-binding domain can promote minimal recruitment of Kinesin-1 on microtubules in oocytes.** (A) Stage 9 oocytes of the indicated genotypes were permeabilized for 1 h, fixed and labelled with an anti-tubulin (red in the merge column, monochrome elsewhere) and an anti-Kinesin-1 antibody (green in the merge column, monochrome elsewhere). Scale bar: 50  $\mu$ m. The right part shows enlarged views of the posterior poles. Scale bar: 20  $\mu$ m. Wild type and *Ens-GFP* show a strong KHC labelling at the posterior side, in contrast to *ensc* or *MBD-GFP* oocytes, in which KHC is not detectable. *KBD-GFP* oocytes displayed diminished KHC targeting. (B) Scatter dot plot showing the mean KHC recruitment (a.u. $\pm$ s.d.) at the posterior side of stage 9 oocytes. Control ( $n=7$ ,  $2.41\pm0.59$ ), *ensc* ( $n=8$ ,  $1.20\pm0.59$ ), *Ens-GFP* ( $n=11$ ,  $2.24\pm0.62$ ), *MBD-GFP* ( $n=8$ ,  $1.25\pm0.21$ ) and *KBD-GFP* ( $n=9$ ,  $1.81\pm0.34$  nm/s) ooplasm. \*\* $P<0.001$ , \*\*\* $P<0.0001$ , Wilcoxon test. ns, not significant. (C) Stage 10B oocytes of the indicated genotypes were labelled for tubulin (red in the merge column, monochrome elsewhere) and KHC (green in the merge column, monochrome elsewhere). In control oocytes, KHC colocalizes with cytoplasmic bundles of MTs. KHC is lost from the MT network in *ensc* and *MBD* oocytes and appears as aggregates around the MTs of these oocytes. *Ens-GFP* rescues the KHC targeting to MT bundles. Most *KBD* oocytes (bottom panels) display enrichment of KHC aggregates around cytoplasmic MT bundles, but only few of these bundles exhibit a clear KHC labelling (purple arrow). The right-hand images show enlargements of the outlined areas. Scale bars: 50  $\mu$ m; 20  $\mu$ m in enlargements.

Kinesin-1 to MTs (Metzger et al., 2012). Interestingly, this targeting model of Kinesin-1 by MAP7 seems to be required to promote branch formation in rat neurones but is not essential for axon growth (Tymanskyj et al., 2018). Finally, this direct recruitment platform model is supported *in vitro*, as the Kinesin-1 motor is strongly recruited on Ensconsin-labelled MTs (Monroy et al., 2018, Fig. 5). Our study shows that an additional level of regulation comes into play. In fly NBs, Ensconsin and Kinesin-1 are jointly involved in the centrosome separation process (Gallaud et al., 2014). As shown here, this defective centrosomal separation phenotype is completely restored by the simple expression of KBD, independent of microtubules, as we show that KBD does not have the property of binding microtubules. These results confirm the ability of KBD to activate Kinesin-1 in S2 cells and in rat neurones (Barlan et al., 2013; Tymanskyj et al., 2018). This activation is supported by the fact that the KBD/Kinesin-1 motor complex can stimulate the binding of Kinesin-1 to MTs *in vitro* and *in vivo* (Fig. 5B). We believe that this stimulation of the motor binding can occur in solution because we were not able to detect any association of the KBD with MTs either *in vivo* or *in vitro*, as also recently shown by other groups using rat and human Ensconsin (MAP7) (Hooikaas et al., 2019; Tymanskyj et al., 2018). Interestingly, this interaction between Ensconsin and KHC is observed in cell extracts, with or without polymerized microtubules (this work). Intra-molecular auto-inhibition has already been documented through interaction between the motor domain and the tail domain of KHC (Verhey et al., 2011). However, the interaction domain between Ensconsin and Kinesin-1 has been mapped on a different domain on the stem of the *Drosophila* Kinesin-1 stalk, a domain that has not been so far described to exert any self-inhibiting properties on the motor domain. It is possible, as suggested by other groups, that this self-inhibition may be relieved after binding to the KBD of Ensconsin (Hooikaas et al., 2019; Monroy et al., 2018) (see Fig. 5). The relief of inhibition is probably a very transient phenomenon and the disinhibited form of Kinesin-1 has to quickly find a microtubule to land before returning to the auto-inhibited form. This ephemeral interaction between Ensconsin and Kinesin-1 is certainly crucial because Ensconsin is strongly anchored on MTs and a strong interaction with Kinesin-1 would impair subsequent Kinesin-1 movement and probably the jump between crossing MTs, an event

proposed to trigger branch formation in neurons (Tymanskyj et al., 2018). Altogether, it will be interesting to examine in the future how these auto-inhibition domains cooperate to regulate Kinesin-1 function in space and time.

On the other hand, this full rescue of Kinesin-1 function is not validated in *ensc* mutant oocytes: the KBD expression only favours a partial localization of Gurken and Stauf. Interestingly, a recent study has demonstrated that Stauf targeting to the posterior pole is a two-step Kinesin-1-dependent process that occurs during stage 9 and 10B of oogenesis. During stage 9, Stauf particles are transported via Kinesin-1 on the polarized MT network, the plus ends of which point towards the posterior pole where these particles are anchored by Myosin V. During stage 10B, the polarized MT network is completely reorganized and Kinesin-1 MT sliding occurs between cytoplasmic bundles and stable cortically anchored MTs. This sliding is responsible for the very fast streaming of Stauf particles that are captured at the posterior pole. These two modes of transport are required for full Stauf delivery (Lu et al., 2018). Interestingly, KBD was able to support 75% of wild-type Kinesin-1-mediated transport of Stauf at stage 9 but was largely inefficient for ooplasm streaming at stage 10B. Our hypothesis is that Kinesin-1 demand during stage 9 is low, suggesting, similar to centrosome separation in NBs, that a weak targeting of Kinesin-1 to the polarized MT arrays by KBD is sufficient for biased transport toward the cortex. Oocyte streaming and MT organization at stage 10B probably requires much more Kinesin-1 targeting to the MT network, which can not be supported by the KBD alone (Serbus et al., 2005).

It is essential to keep in mind, however, that the KBD does not exist in normal cells and corresponds to a domain only present in the full-length Ensconsin protein. However, our rescue experiments have allowed us to reveal a moderate but physiologically relevant property of KBD in targeting Kinesin-1 to the microtubule network *in vivo* and *in vitro*. We believe that MT-bound Ensconsin provides a platform for simultaneously recruiting and transiently stimulating Kinesin-1 binding to MTs (Fig. 5C). The Ensconsin family of proteins can therefore be considered as 'Microtubule-tethered Kinesin-1 activators' (Hooikaas et al., 2019). Remarkably, our data suggest that the model based on high Kinesin-1 targeting of MTs via full-length Ensconsin is not an absolute requirement for development, as KBD flies are viable. This confirms the idea that only a small amount of Kinesin-1 targeting MTs is sufficient to support fly development, at least under laboratory conditions where animals are maintained. However, unlike the flies rescued by the full-length Ensconsin, KBD females remain sterile, perhaps because, in addition to oocyte polarization defects, the *ensc* mutant meiotic spindle is abnormal and does not support correct chromosome segregation (Professor Ohkura, University of Edinburgh, UK, personal communication). In flies, the observed weak targeting of Kinesin-1 on the MT network by KBD is sufficient to sustain Kinesin-1 function in S2 cells, neuroblasts and stage oocytes 9, but not in stage 10B oocytes (Barlan et al., 2013). However, even if the size factor is the first thing that comes to mind when comparing these four cell types, we cannot rule out the hypothesis that the observed recruitment differences are also dependent on other levels of regulation. We cannot exclude, as observed for other MAPs, that Kinesin-1 affinity for the microtubule is also directly related to the presence of particular isoforms of tubulin proteins or under the control of a tubulin code that could vary between cells (Yu et al., 2015). Further studies will be needed to understand how the optimal targeting of Kinesin-1 by Ensconsin on microtubules is achieved according to different cell types.



**Fig. 5. The Ensconsin Kinesin-binding domain can promote recruitment of K560 to MTs *in vitro*.** (A) Scheme of the MT-binding assay. KBD and K560, a truncated KHC protein (amino acids 1-560), were mixed in the presence of polymerized MTs and subjected to centrifugation (see Materials and Methods). MT pellets (P) and supernatants (S) were subsequently analysed by western blot. (B) Coomassie Blue-stained SDS-PAGE gel shows the binding behaviour of 500 nM Ensconsin-KBD and/or 500 nM K560 in the presence of 2.5  $\mu$ M taxol-stabilized microtubules. K560 levels increase in the MT pellet in the presence of KBD. The percentages of K560 in the MT pellet are  $46.6 \pm 3.9\%$  and  $75.1 \pm 7.1\%$  in the absence and presence of Ensconsin KBD, respectively ( $n=3$ ,  $P=0.0036$ ). Ensconsin KBD is detected in the MT pellet only in the presence of K560, indicating direct interaction ( $59.7 \pm 10.6\%$  versus  $2.0 \pm 1.7\%$ ,  $n=3$ ;  $P=0.0007$ ). (C) Speculative model for dual Kinesin-1 recruitment to MTs and consequences for several Kinesin-1-dependent processes in *Drosophila*. (a) Kinesin-1 (orange) shows intrinsic MT binding, which is weak because of auto-inhibition properties. Flies without Kinesin-1 or Ensconsin cannot separate their centrosomes during interphase, and cannot perform KHC-mediated transport or oocyte streaming during stages 9 and 10B of oogenesis, respectively. (b) Our data suggest that a truncated Kinesin-1 that shows intrinsic binding to MTs can be weakly stimulated after transient interaction with KBD, which may cause a relief of auto-inhibition (red). *In vivo*, this targeting of Kinesin-1 molecules to MTs is sufficient to sustain normal centrosome separation in brain NBs and almost complete Staufen-mediated transport along the polarized MTs network of stage 9 oocytes, but not oocyte streaming in stage 10B of oogenesis. (c) *In vivo*, MT-anchored Ensconsin serves as a platform to simultaneously recruit and stimulate Kinesin-1 targeting to the MTs. This dual activation is essential for efficient oocyte streaming in stage 10B oocytes.

## MATERIALS AND METHODS

### DNA constructs

Histidine-tagged expression constructs were generated as previously described using: full-length Ensconsin; Ensconsin-MBD, the N-terminal domain of which contains the microtubule-binding domain, also referred to as EHR1; and Ensconsin-KBD, the C-terminal domain containing the Kinesin-binding domain, also referred to as EHR2 (Gallaud et al., 2014; Sung et al., 2008). Ensconsin-MBD and Ensconsin-KBD were also introduced into the pUWG vector to generate fly expression constructs for the ubiquitous expression of GFP-tagged proteins. Full-length Ensconsin was introduced in the pTWV vector to generate overexpression of a VenusFP-protein under the control of the GAL protein. pUWG and pTWG were purchased from the Drosophila Genomics Resource Center. The *Drosophila* Kinesin-1 expression construct

K560 (amino acids 1-560, a gift from R. Vale, University of California, San Francisco, CA, USA) was cloned in frame using Gibson cloning into pET28 vector with a C-terminal mScarlet-strepII cassette (Monroy et al., 2018).

### Fly strains

Flies were maintained under standard conditions at 25°C. All studies were performed using *enscΔnull* and *enscΔN ensconsin* mutants (Sung et al., 2008). In contrast with previous studies, western blotting experiments using an antibody raised against the C-terminal region of Ensconsin revealed the *enscΔN* allele is a null allele (Gallaud et al., 2014). *enscΔnull* is also a null allele but the deletion also removes a piece of the neighbouring gene (Sung et al., 2008). All experiments were therefore performed in trans-heterozygous *enscΔnull/enscΔN* flies, hereafter referred to as *ensc* flies.

*khc* mutant flies carrying amino acid substitutions have been described elsewhere and were provided by A. Guichet (Institut Jacques Monod, Paris, France), B. Saxton (University of California, Santa Cruz, CA, USA) and A. Ephrussi (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany) (Djagaeva et al., 2012). We have shown in a previous study that the combination of *khc*<sup>27</sup> (null allele) and *khc*<sup>63</sup> (hypomorphic allele) used in this study exhibits severe centrosome separation defects before mitosis (Gallaud et al., 2014).

Transgenic flies were obtained from BestGene following P-element-mediated transformation with the pTWV vector containing full-length Ensconsin, or the pUWG vector containing the FL-Ensconsin, Ensconsin-KBD or Ensconsin-MBD sequences. The Ensconsin-GFP and the Ensconsin-KBD-GFP but not the Ensconsin-MBD-GFP transgenic proteins rescued the semi-lethality of the *ensconsin*Δnull and *ensconsin*ΔN mutants, and the trans-heterozygous *ensconsin* flies. Unless specified, Ensconsin-GFP, KBD-GFP and MBD-GFP refer to transgenic animals expressing the corresponding GFP-tagged proteins in an *ensconsin* background. RFP-tubulin-expressing flies were given to us by Renata Basto (Institut Curie, Paris, France). The 69B-GAL4 strain is from Bloomington Stock Center and was used to drive overexpression of Ensconsin-Venus in brain tissues (Ensconsin OE). All other GFP and RFP fusion proteins were ubiquitously produced under the control of the polyubiquitin promoter.

### Antibodies and western blotting

The monoclonal YL1/2 rat anti-detyrosinated tubulin antibody (1:200) and the mouse monoclonal and rabbit polyclonal anti-phosphorylated histone H3 (Ser10) antibodies (1:500) were obtained from Millipore. The mouse anti-GFP monoclonal antibody (1:1000) was obtained from Roche. The rabbit and rabbit anti-actin (1:4000) polyclonal antibodies, and the anti-Staufen antibody (1:1000) are from Santa Cruz Biotechnology. The rabbit polyclonal anti-KHC antibody (1:2000) was obtained from Cytoskeleton. The mouse monoclonal anti-Gurken antibody (1:200) was from the Developmental Studies Hybridoma Bank. The production of the anti-Ensconsin antibody has been previously described, and the antibody was raised against the Kinesin-binding domain (Gallaud et al., 2014). The goat peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:5000) were obtained from Jackson ImmunoResearch and donkey Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (1:1000) came from Life Technologies. For western blotting, ECL reagent was purchased from Thermo Fisher Scientific.

### Live microscopy

Brains expressing the various GFP- or RFP-tagged proteins were dissected in Schneider's *Drosophila* medium containing 10% FCS. Isolated brains were loaded and mounted on stainless steel slides. The preparations were sealed with mineral oil (Sigma) as previously described (Gallaud et al., 2014). Images were acquired using a spinning-disk system mounted on an Eclipse Ti inverted microscope (Nikon) equipped with a 60×1.4 NA objective at 25°C. Z-series were acquired every 30 or 60 s with a Photometrics CCD camera (CoolSNAP HQ2) and an sCMOS ORCA-Flash4.0 (Hamamatsu) controlled using MetaMorph acquisition software (version X). Images were processed using ImageJ software and are presented as maximum-intensity projections. Embryos were collected on agar plates supplemented with grape juice at 25°C. They were dechorionated by hand using double-sided adhesive tape, then mounted in mineral oil as previously described (Giet et al., 2002). Z-series images were acquired every 30 s using either a spinning disk system or a Leica SP5 confocal microscope equipped with a 40×1.3 NA objective at 25°C. For ooplasmic streaming analyses, young females were mated with males and fattened with dried yeast for 3 (controls, KBD-GFP or Ensconsin-GFP) to 5 days (MBD-GFP or *ensconsin*), anesthetized and their ovaries removed from the abdomen with fine forceps. Stage 10B oocytes were isolated with two 27-gauge syringes needles in Halocarbon oil (Sigma), mounted and observed by light microscopy using a DMRXA2 microscope (Leica). Velocity analyses of the particles were performed as described in two separate studies (Lu et al., 2016; Serbus et al., 2005) except that three kymographs were obtained for each oocyte along active flows and five particles (15 per oocyte) were analysed for each kymograph using the Multikymograph plug-in for Fiji.

Observation of Ensconsin-GFP, KBD-GFP and MBD-GFP was performed in young oocytes also expressing RFP-tubulin after fast dissection

of the ovary in PBS and direct observation of the live tissues under the microscope.

The analysis of centrosome separation in larval brain neuroblasts was performed as described previously (Gallaud et al., 2014). The mother and daughter centrosomes were easily distinguished by their different microtubule nucleation potentials shortly before mitosis (Rebollo et al., 2007). Briefly, the separation angle between the two centrosomes was determined 30 s before NEBD, by drawing a line crossing the mother centrosome, the nucleus centre and the daughter centrosome, and calculated using the angle measurement tool for Fiji. In control neuroblasts, most centrosomes are fully separated before mitosis and this angle is between 120 and 180°.

### Immunofluorescence in fly oocytes

Oocytes were collected from 2-day-old females. To visualize the MT network, endogenous Ensconsin, KHC and Ensconsin-GFP fusion protein, oocytes were permeabilized at 25°C in 1% Triton X100 in BRB80 buffer [80 mM K-PIPES, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA (pH 6.8)] and fixed with −20°C methanol as described previously (Januschke et al., 2006).

For Staufen and Gurken localization, four to eight ovaries were fixed with PBS buffer containing 4% paraformaldehyde and 0.1% Triton X-100, washed three times for 5 min in PBST (PBS+0.1% Triton X-100) and blocked on PBST containing 1% BSA. Incubation with the primary antibodies was performed overnight at room temperature in BBT (PBS containing 0.1% BSA and 0.1% Tween 20). The ovaries were then briefly washed three times and three times for 30 min each in BBT. The Alexa-conjugated secondary antibody was incubated for 2 h at room temperature. The ovaries were then washed three times for 15 min each time in PBST, dissected and mounted in ProLong Gold (Invitrogen).

### Immunofluorescence in fly brain by methanol fixation

Wild-type or *khc*<sup>27</sup>/*khc*<sup>63</sup> larval brains were dissected in Schneider media supplemented with 10% of decomplexed foetal calf serum (Invitrogen). When five brains were dissected, they were transferred in 20 µl of Schneider media. The brains were then gently aspirated with the tip of a Pasteur pipette and immediately transferred in 1 ml of methanol pre-chilled at −20°C. The tubes were then transferred for 15 min at −20°C. After fixation, the methanol was discarded and the tissues were washed three times for 5 min in PBST with gentle agitation at room temperature, blocked with PBSTB (PBST supplemented with 1% BSA) and incubated with primary antibodies overnight at 4°C in PBSTB. The brains were then washed three times for 15 min in PBST and incubated with secondary antibodies for 2 h at room temperature in PBSTB. After three washes in PBST, the tissues were mounted in ProLong Gold (Invitrogen).

### Protein expression and purification

Tubulin was isolated from porcine brain using the high-molarity PIPES procedure as previously described (Castoldi and Popov, 2003). For bacterial expression, K560-mScarlet, BL21-RIPL cells were grown at 37°C until ~0.6 OD and protein expression was induced using 0.1 mM IPTG. Cells were grown overnight at 18°C, harvested and frozen. Cell pellets were resuspended in lysis buffer [50 mM Tris (pH 8), 150 mM K-acetate, 2 mM Mg-acetate, 1 mM EGTA, 10% glycerol] with protease inhibitor cocktail (Roche), 1 mM DTT, 1 mM PMSF and DNaseI. Cells were then passed through an Emulsiflex press and cleared by centrifugation at 23,000 g for 20 min. Clarified lysate was passed over a column with Streptactin Superflow resin (Qiagen). After incubation, the column was washed with four column volumes of lysis buffer, then bound proteins were eluted with 3 mM desthiobiotin (Sigma) in lysis buffer. Eluted proteins were concentrated on Amicon concentrators and passed through a superose-6 (GE Healthcare) gel-filtration column in lysis buffer using a Bio-Rad NGC system. Peak fractions were collected, concentrated and flash frozen in LN<sub>2</sub>. Protein concentration was determined by measuring the absorbance of the fluorescent protein tag and calculated using the molar extinction coefficient of the tag. The resulting preparations were analysed by SDS-PAGE. Bacterial expression of hexa histidine-tagged KBD was performed as described previously (Gallaud et al., 2014) except that the protein was

dialysed overnight against PBS, and concentrated using Amicon Ultra-4 Centrifugal filters (Millipore). The proteins were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Immunoprecipitation experiments

Thirty females expressing either MBD, KBD or full-length GFP-tagged Enscnscin were lysed using a French press in 500  $\mu\text{l}$  of lysis buffer [LB 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA (pH 7.4)] supplemented with 0.05% NP-40, 1 mM DTT containing 5 $\times$  proteases inhibitors (Roche). The extracts were centrifuged at 10,000  $g$  for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$  and the supernatants were incubated with 10  $\mu\text{l}$  of GFP-Trap beads (Chromotek) for 1 h on a rotating wheel. The beads were washed three times with LB and the bound proteins were analysed by western blotting with anti-GFP and anti-KHC antibodies.

### Microtubule co-sedimentation assay

Microtubules were prepared by polymerizing 25 mg/ml of porcine tubulin in assembly buffer (BRB80 buffer supplemented with 1 mM GTP, 1 mM DTT) at  $37^{\circ}\text{C}$  for 15 min, then a final concentration of 20  $\mu\text{M}$  taxol was added to the solution, which was incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for an additional 15 min. Microtubules were pelleted over a 25% sucrose cushion at 100,000  $g$  at  $25^{\circ}\text{C}$  for 10 min, then resuspended in BRB80 buffer with 1 mM DTT and 10  $\mu\text{M}$  taxol. Binding reactions were carried out by mixing 500 nM of sfGFP-Enscnscin-KBD and/or 500 nM mScarlet-K560 (that had been pre-centrifuged at 100,000  $g$ ) with 2.5  $\mu\text{M}$  of microtubules in assay buffer [50 mM Tris (pH 8), 50 mM potassium acetate, 2 mM magnesium acetate, 1 mM EGTA, 10% glycerol and supplemented with 1 mM DTT, 10  $\mu\text{M}$  taxol] and incubated at  $25^{\circ}\text{C}$  for 10 min. The mixtures were then pelleted at 90,000  $g$  at  $25^{\circ}\text{C}$  for 10 min. Supernatant and pellet fractions were recovered, resuspended in sample buffer, run on an SDS-PAGE gel and then stained with Coomassie Blue. Protein band intensities were quantified using ImageJ.

### Statistical analysis

All statistical tests were performed using the Wilcoxon test or a two-tailed Student's  $t$ -test for MT co-pelleting assays.

### Acknowledgements

We thank R. Basto for the kind gift of RFP-tubulin-expressing flies. We thank Kahina Sadaoui for the preliminary functional analyses of Enscnscin domains during oocyte development. We thank the Microscopy Rennes Imaging Center for the microscopy facilities. We thank Christelle Benaud, Romain Gibeaux and Denis Chrétien for critical reading and helpful comments on the manuscript.

### Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

### Author contributions

Conceptualization: M.M., B.Y.M., E.G., R.C., A.G., K.M.O.-M., R.G.; Methodology: M.M., B.Y.M., E.G., R.C., A.P., A.G., K.M.O.-M., R.G.; Validation: M.M., B.Y.M., A.P., K.M.O.-M., R.G.; Formal analysis: M.M., B.Y.M., E.G., R.C., K.M.O.-M., R.G.; Investigation: M.M., B.Y.M., E.G., R.C., A.P., A.G., K.M.O.-M., R.G.; Writing - original draft: M.M., R.G.; Writing - review & editing: M.M., B.Y.M., E.G., R.C., L.R.-P., A.G., K.M.O.-M., R.G.; Visualization: M.M., B.Y.M., E.G., R.C., A.G., K.M.O.-M., R.G.; Supervision: L.R.-P., A.G., K.M.O.-M., R.G.; Project administration: R.G.; Funding acquisition: K.M.O.-M., R.G.

### Funding

This work was funded by the Ligue Contre le Cancer and the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer. M.M. is a doctoral fellow of the Région Bretagne and the Ligue Contre le Cancer. E.G. was a doctoral fellow of the Région Bretagne. R.G. is supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the University of Rennes, The Ligue Contre le Cancer and the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer. A.G. was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and by the Fondation ARC pour la recherche sur le cancer (PJA 20161204931). K.M.O.-M. is supported by the National Institutes of Health (R01HD080981), the March of Dimes Foundation and the Simons Foundation. Deposited in PMC for release after 12 months.

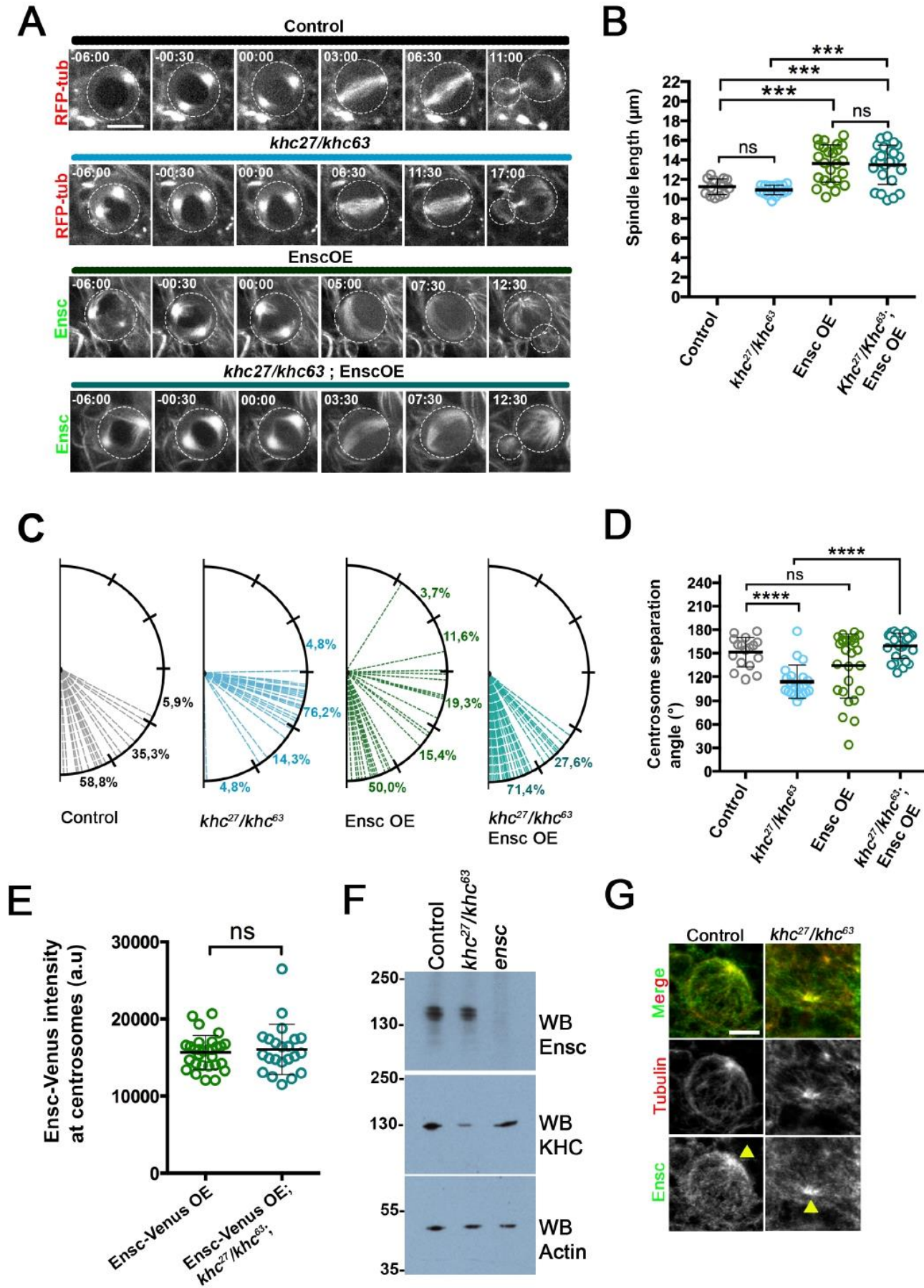
### Supplementary information

Supplementary information available online at <http://dev.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dev.171579.supplemental>

### References

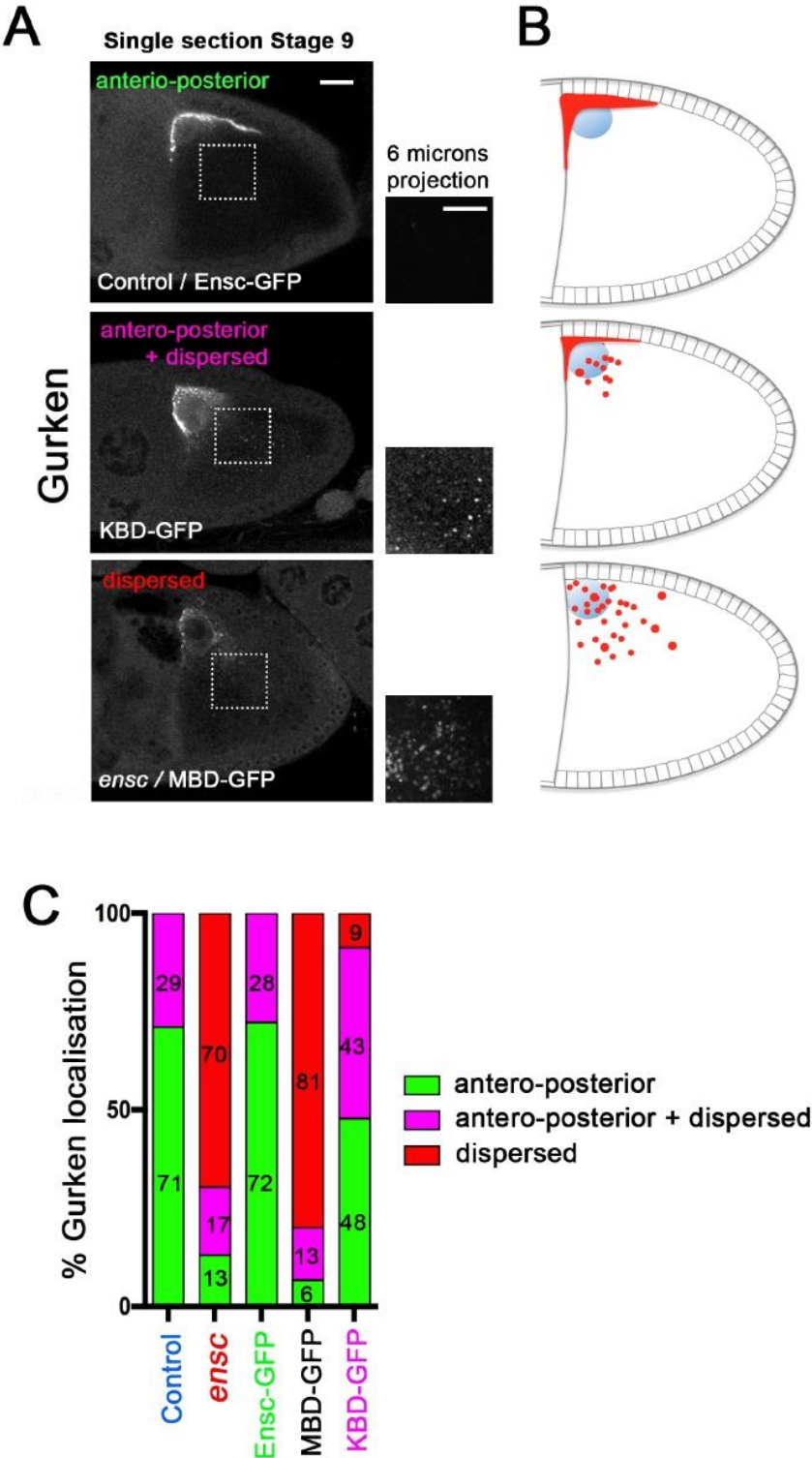
- Barlan, K. and Gelfand, V. I. (2017). Microtubule-based transport and the distribution, tethering, and organization of organelles. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, a025817. doi:10.1101/cshperspect.a025817
- Barlan, K., Lu, W. and Gelfand, V. I. (2013). The microtubule-binding protein enscnscin is an essential cofactor of kinesin-1. *Curr. Biol.* **23**, 317-322. doi:10.1016/j.cub.2013.01.008
- Brendza, R. P., Serbus, L. R., Duffy, J. B. and Saxton, W. M. (2000). A function for kinesin I in the posterior transport of oskar mRNA and Staufen protein. *Science* **289**, 2120-2122. doi:10.1126/science.289.5487.2120
- Brendza, R. P., Serbus, L. R., Saxton, W. M. and Duffy, J. B. (2002). Posterior localization of dynein and dorsal-ventral axis formation depend on kinesin in *Drosophila* oocytes. *Curr. Biol.* **12**, 1541-1545. doi:10.1016/S0960-9822(02)01108-9
- Bulinski, J. C. and Bossler, A. (1994). Purification and characterization of enscnscin, a novel microtubule stabilizing protein. *J. Cell Sci.* **107**, 2839-2849.
- Bulinski, J. C., Odde, D. J., Howell, B. J., Salmon, T. D. and Waterman-Storer, C. M. (2001). Rapid dynamics of the microtubule binding of enscnscin in vivo. *J. Cell Sci.* **114**, 3885-3897.
- Castoldi, M. and Popov, A. V. (2003). Purification of brain tubulin through two cycles of polymerization-depolymerization in a high-molarity buffer. *Protein Expr. Purif.* **32**, 83-88. doi:10.1016/S1046-5928(03)00218-3
- Conduit, P. T. and Raff, J. W. (2010). Cnn dynamics drive centrosome size asymmetry to ensure daughter centriole retention in *Drosophila* neuroblasts. *Curr. Biol.* **20**, 2187-2192. doi:10.1016/j.cub.2010.11.055
- Djagaeva, I., Rose, D. J., Lim, A., Venter, C. E., Brendza, K. M., Moua, P. and Saxton, W. M. (2012). Three routes to suppression of the neurodegenerative phenotypes caused by kinesin heavy chain mutations. *Genetics* **192**, 173-183. doi:10.1534/genetics.112.140798
- Duncan, J. E. and Warrior, R. (2002). The cytoplasmic dynein and kinesin motors have interdependent roles in patterning the *Drosophila* oocyte. *Curr. Biol.* **12**, 1982-1991. doi:10.1016/S0960-9822(02)01303-9
- Faire, K., Waterman-Storer, C. M., Gruber, D., Masson, D., Salmon, E. D. and Bulinski, J. C. (1999). E-MAP-115 (enscnscin) associates dynamically with microtubules in vivo and is not a physiological modulator of microtubule dynamics. *J. Cell Sci.* **112**, 4243-4255.
- Ferrandon, D., Elphick, L., Nüsslein-Volhard, C. and St Johnston, D. (1994). Staufen protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell* **79**, 1221-1232. doi:10.1016/0092-8674(94)90013-2
- Gallaud, E., Caous, R., Pascal, A., Bazile, F., Gagné, J.-P., Huet, S., Poirier, G. G., Chrétien, D., Richard-Parpaillon, L. and Giet, R. (2014). Enscnscin/Map7 promotes microtubule growth and centrosome separation in *Drosophila* neural stem cells. *J. Cell Biol.* **204**, 1111-1121. doi:10.1083/jcb.201311094
- Giet, R., McLean, D., Descamps, S., Lee, M. J., Raff, J. W., Prigent, C. and Glover, D. M. (2002). *Drosophila* Aurora A kinase is required to localize D-TACC to centrosomes and to regulate astral microtubules. *J. Cell Biol.* **156**, 437-451. doi:10.1083/jcb.200108135
- Heald, R. and Khodjakov, A. (2015). Thirty years of search and capture: The complex simplicity of mitotic spindle assembly. *J. Cell Biol.* **211**, 1103-1111. doi:10.1083/jcb.201510015
- Hoolkaas, J., Martin, M., Kuijntjes, G., Peeters, C., Katrukha, E., Ferrari, L., Stucchi, R., Verhagen, D., van Riel, W., Maarten Altaar, A. (2019). MAP7 family proteins are microtubule-tethered allosteric activators of kinesin-1. *J. Cell Biol.* **218**, 1298-1318. doi:10.1083/jcb.201808065
- Januschke, J., Gervais, L., Dass, S., Kaltschmidt, J. A., Lopez-Schier, H., St Johnston, D., Brand, A. H., Roth, S. and Guichet, A. (2002). Polar transport in the *Drosophila* oocyte requires Dynein and Kinesin I cooperation. *Curr. Biol.* **12**, 1971-1981. doi:10.1016/S0960-9822(02)01302-7
- Januschke, J., Gervais, L., Gillet, L., Keryer, G., Bornens, M. and Guichet, A. (2006). The centrosome-nucleus complex and microtubule organization in the *Drosophila* oocyte. *Development* **133**, 129-139. doi:10.1242/dev.02179
- Januschke, J., Llamazares, S., Reina, J. and Gonzalez, C. (2011). *Drosophila* neuroblasts retain the daughter centrosome. *Nat. Commun.* **2**, 243. doi:10.1038/ncomms1245
- Lu, W., Winding, M., Lakonishok, M., Wildonger, J. and Gelfand, V. I. (2016). Microtubule-microtubule sliding by kinesin-1 is essential for normal cytoplasmic streaming in *Drosophila* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, E4995-E5004. doi:10.1073/pnas.1522424113
- Lu, W., Lakonishok, M., Serpinskaya, A. S., Kirichenbuechler, D., Ling, S.-C. and Gelfand, V. I. (2018). Ooplasmic flow cooperates with transport and anchorage in *Drosophila* oocyte posterior determination. *J. Cell Biol.* **217**, 3497-3511. doi:10.1083/jcb.201709174
- McHedlishvili, N., Matthews, H. K., Corrigan, A. and Baum, B. (2018). Two-step interphase microtubule disassembly aids spindle morphogenesis. *BMC Biol.* **16**, 14. doi:10.1186/s12915-017-0478-z
- Metzger, T., Gache, V., Xu, M., Cadot, B., Folker, E. S., Richardson, B. E., Gomes, E. R. and Baylies, M. K. (2012). MAP and kinesin-dependent nuclear positioning is required for skeletal muscle function. *Nature* **484**, 120-124. doi:10.1038/nature10914

- Mitchison, T. and Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**, 237-242. doi:10.1038/312237a0
- Monroy, B. Y., Sawyer, D. L., Ackermann, B. E., Borden, M. M., Tan, T. C. and Ori-McKenney, K. M. (2018). Competition between microtubule-associated proteins directs motor transport. *Nat. Commun.* **9**, 1487. doi:10.1038/s41467-018-03909-2
- Neuman-Silberberg, F. S. and Schupbach, T. (1993). The *Drosophila* dorsoventral patterning gene *gurken* produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF alpha-like protein. *Cell* **75**, 165-174. doi:10.1016/S0092-8674(05)80093-5
- Palacios, I. M. and St Johnston, D. (2002). Kinesin light chain-independent function of the Kinesin heavy chain in cytoplasmic streaming and posterior localisation in the *Drosophila* oocyte. *Development* **129**, 5473-5485. doi:10.1242/dev.00119
- Rebollo, E., Sampaio, P., Januschke, J., Llamazares, S., Varmark, H. and González, C. (2007). Functionally unequal centrosomes drive spindle orientation in asymmetrically dividing *Drosophila* neural stem cells. *Dev. Cell* **12**, 467-474. doi:10.1016/j.devcel.2007.01.021
- Rusan, N. M. and Peifer, M. (2007). A role for a novel centrosome cycle in asymmetric cell division. *J. Cell Biol.* **177**, 13-20. doi:10.1083/jcb.200612140
- Serbus, L. R., Cha, B. J., Theurkauf, W. E. and Saxton, W. M. (2005). Dynein and the actin cytoskeleton control kinesin-driven cytoplasmic streaming in *Drosophila* oocytes. *Development* **132**, 3743-3752. doi:10.1242/dev.01956
- St Johnston, D., Beuchle, D. and Nüsslein-Volhard, C. (1991). *Staufen*, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* **66**, 51-63. doi:10.1016/0092-8674(91)90138-O
- Sung, H.-H., Telley, I. A., Papadaki, P., Ephrussi, A., Surrey, T. and Rorth, P. (2008). *Drosophila* *ensconsin* promotes productive recruitment of Kinesin-1 to microtubules. *Dev. Cell* **15**, 866-876. doi:10.1016/j.devcel.2008.10.006
- Tymanskyj, S. R., Yang, B. H., Verhey, K. J. and Ma, L. (2018). MAP7 regulates axon morphogenesis by recruiting kinesin-1 to microtubules and modulating organelle transport. *Elife* **7**, e36374. doi:10.7554/eLife.36374
- Verhey, K. J., Kaul, N. and Soppina, V. (2011). Kinesin assembly and movement in cells. *Annu. Rev. Biophys.* **40**, 267-288. doi:10.1146/annurev-biophys-042910-155310
- Walczak, C. E. and Heald, R. (2008). Mechanisms of mitotic spindle assembly and function. *Int. Rev. Cytol.* **265**, 111-158. doi:10.1016/S0074-7696(07)65003-7
- Yu, I., Garnham, C. P. and Roll-Mecak, A. (2015). Writing and Reading the Tubulin Code. *J. Biol. Chem.* **290**, 17163-17172. doi:10.1074/jbc.R115.637447



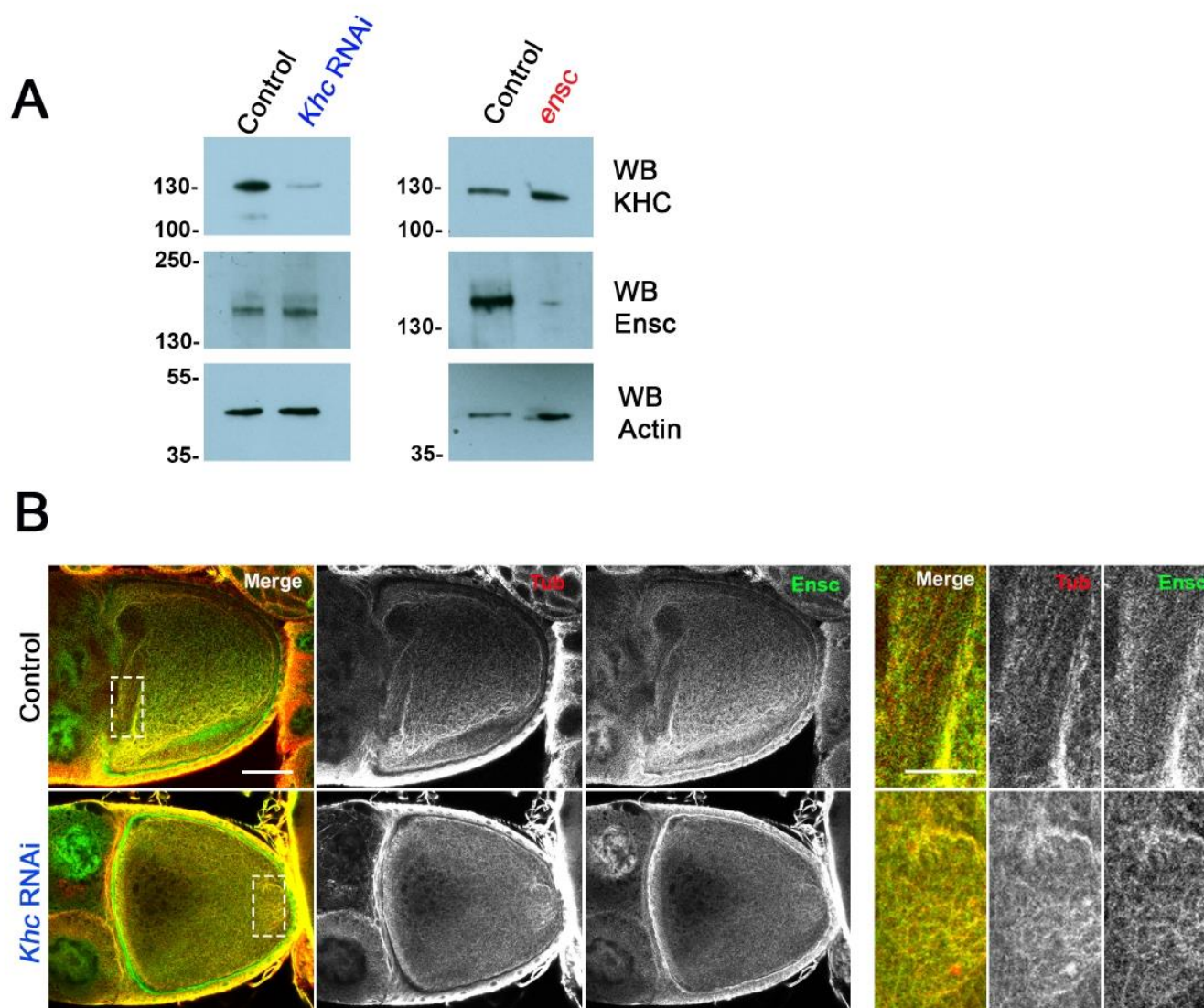
**Figure S1. Overexpression of Ensconsin increases mitotic spindle length in a Kinesin-1-independent manner but efficiently rescues *khc*-dependent centrosome separation defects and in brain NBs.**

A) Dividing neuroblasts were imaged in four different genotypes: control, *khc*<sup>27</sup>/*khc*<sup>63</sup>, Ensconsin-Venus overexpression (Ens OE) and in *khc*<sup>27</sup>/*khc*<sup>63</sup> overexpressing Ensconsin (*khc*<sup>27</sup>/*khc*<sup>63</sup>; Ens OE). Scale bar: 10  $\mu$ m. Time is min:sec. B) Box plot showing the mean ( $\pm$  s.d.) mitotic spindle length analysis for control ( $11.3 \pm 0.8$   $\mu$ m,  $n=14$ ), *khc*<sup>27</sup>/*khc*<sup>63</sup> ( $10.9 \pm 0.5$   $\mu$ m,  $n=17$ ), Ens OE ( $13.6 \pm 1.9$   $\mu$ m,  $n=24$ ), *khc*<sup>27</sup>/*khc*<sup>63</sup>; Ens OE ( $13.5 \pm 2.0$   $\mu$ m,  $n=24$ ) NBs. \*\*\*,  $P < 0.001$  (Wilcoxon test). C) Analysis of centrosome separation angle ( $\alpha$ ) at NEBD for the indicated genotypes. D) Box plot showing the mean ( $\pm$  s.d.) centrosome separation angle for control ( $151.4 \pm 19.0^\circ$ ,  $n=17$ ), *khc*<sup>27</sup>/*khc*<sup>63</sup> ( $114.1 \pm 20.7^\circ$ ,  $n=21$ ), Ens OE ( $134.0 \pm 40.3^\circ$ ,  $n=26$ ), *khc*<sup>27</sup>/*khc*<sup>63</sup>; Ens OE ( $159.4 \pm 16.2^\circ$ ,  $n=29$ ) NBs, corresponding to panel C. \*\*\*\*,  $P < 0.0001$  (Wilcoxon test). E) Scatter box blot showing the mean value ( $\pm$  s.d.) of Ens-Venus centrosomal signal (a.u) 30 sec before NEBD in WT ( $15659 \pm 2188$ ,  $n=29$ ) or *khc*<sup>27</sup>/*khc*<sup>63</sup> ( $16038 \pm 3255$ ,  $n=22$ ). F) Western blot showing Ensconsin, KHC and actin (as a loading control) protein levels in WT, *khc*<sup>27</sup>/*khc*<sup>63</sup> mutant and *ensc* mutant brain extracts. KHC levels are stable in *ensc* mutants (and vice versa). G) Endogenous Ensconsin localization during interphase in control (left) and in *khc*<sup>27</sup>/*khc*<sup>63</sup> mutant NBs (right). Tubulin is red in the merge panels and monochrome in the middle panels. Ensconsin is Green in the merge panels and Monochrome in the bottom panels. Scale bar: 5  $\mu$ m.



**Figure S2. Gurken localization in oocytes (revoir les nombreux avec le texte)**

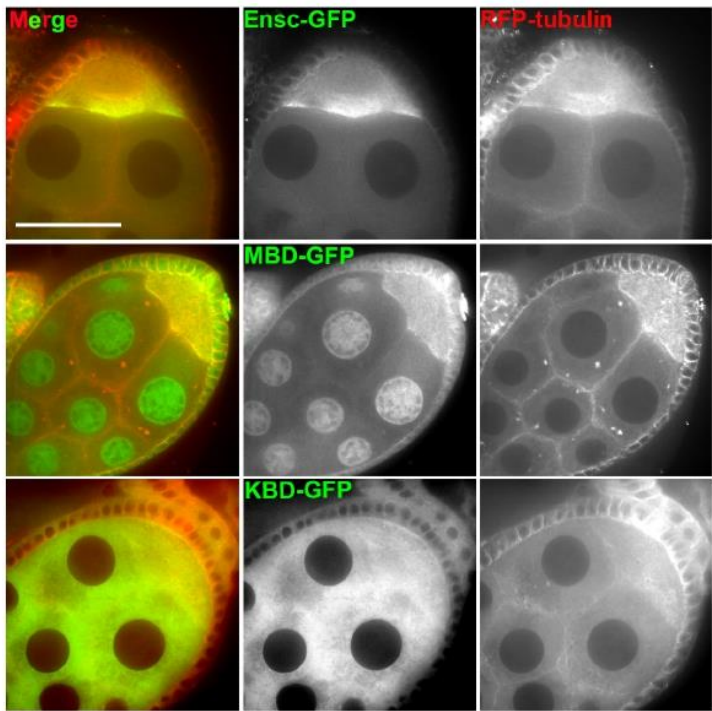
A) Gurken localization patterns at stage 9 in different genetic backgrounds. Gurken is mainly located at the dorsal corner side of the nucleus in both control and *Ensc*-GFP. Note that it can also appear as tiny dots around the nucleus. In *ensc* and MBD-GFP, Gurken signal was dispersed or appeared as tiny spots around the nucleus (bottom). In KBD-GFP oocytes (middle), some oocytes showed a WT Gurken distribution (11/23), a small portion of the oocytes has a Gurken localization pattern comparable to *ensc* mutant (2/23) and the remaining oocytes displayed an intermediate phenotype with a punctiform distribution at the dorsal side corner region (10/23). B) Schematic diagram of Gurken localization (red) in stage 9 oocytes that summarises a representative oocyte for WT and *Ensc*-GFP (top), KBD-GFP (middle) and in *ensc* and MBD-GFP backgrounds (bottom). The nucleus is shown as blue sphere. C) Histogram showing the percentage distribution of Gurken localization in stage 9 oocytes for controls ( $n=14$ ), *ensc* ( $n=23$ ), MBD-GFP ( $n=15$ ), KBD-GFP ( $n=23$ ) and *Ensc*-GFP ( $n=18$ ). Numbers in the columns correspond to percentages.



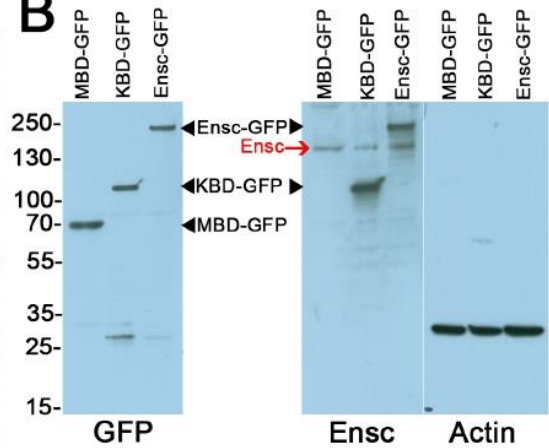
**Figure S3. Ensconsin localization in *khc* RNAi oocytes and Western blot analyses.**

A) Western blot showing KHC, Ensconsin and actin protein levels in control and *khc* RNAi ovary extracts (left) or in control and *ensc* mutant ovary extracts (right). B) Ensconsin (green in the merge panel and monochrome in the middle panels) and MT localization (red in green in the merge panel and monochrome in the right) panels in WT (top, n=10) and *khc* RNAi oocytes (bottom, n=12). *khc* RNAi oocytes display a loss of the large cytoplasmic MTs bundles but Ensconsin is maintained on the remaining MT cytoskeleton. Insets show an enlarged view of the cytoplasmic MTs. Scale bar 50  $\mu$ m and 20  $\mu$ m in the insets.

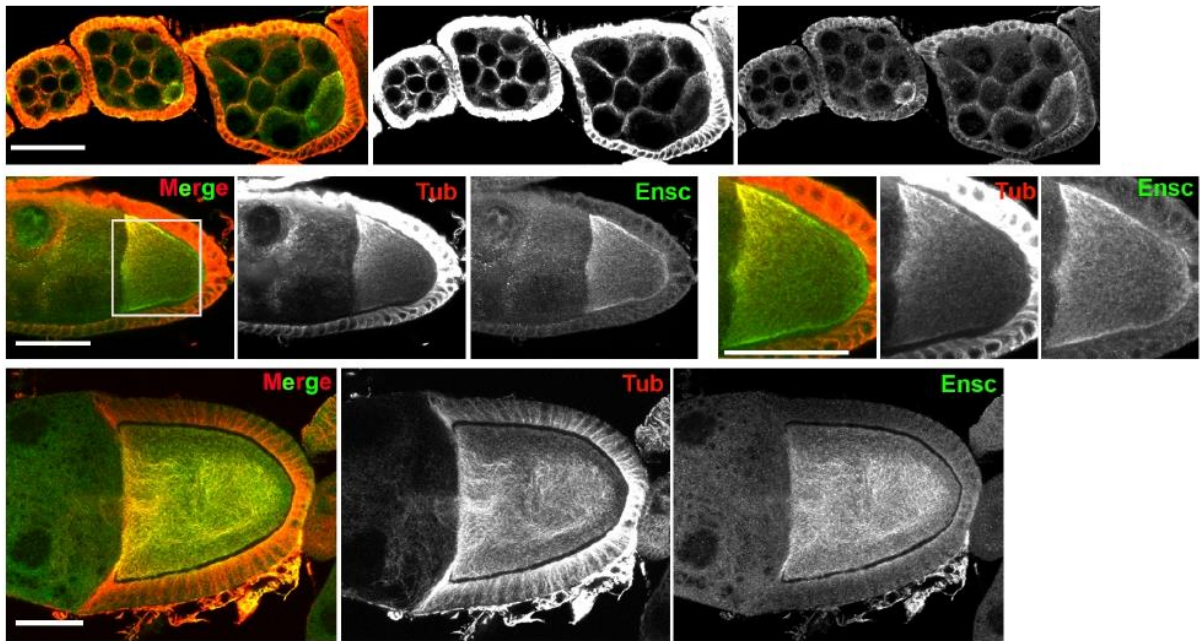
**A**



**B**

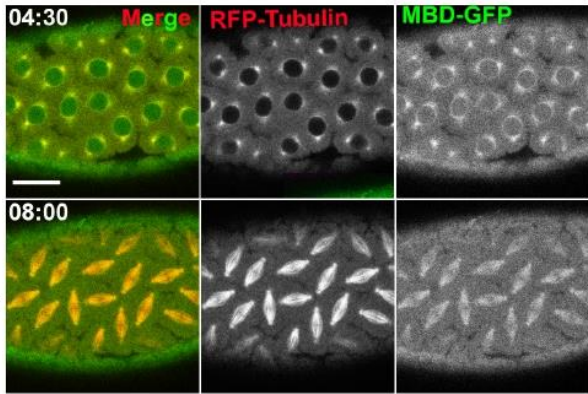


**C**

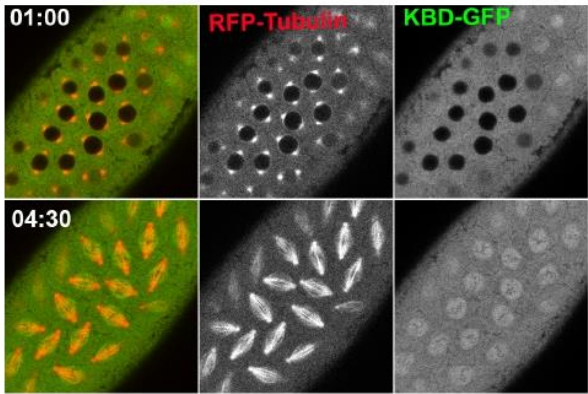


**D**

Prophase  
Metaphase



**E**



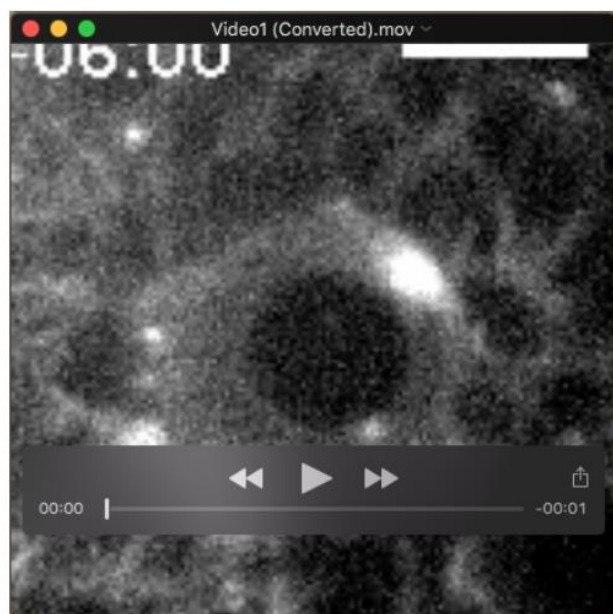
**Figure S4. Localization of Endogenous Ensconsin, Ensc-GFP, KBD-GFP, and MBD-GFP variants in oocytes and in live embryos.**

A) Live localization of Ensc-GFP (top), MBD-GFP (middle) and KBD-GFP (bottom) in live early oocytes expressing RFP-tubulin (Red in the merge channel), in a wild type background. Ensc-GFP and MBD-GFP are present on the MT network of the egg chamber and of the epithelial cells. KBD-GFP does not localize on the MT network. Scale bar: 50  $\mu$ m.

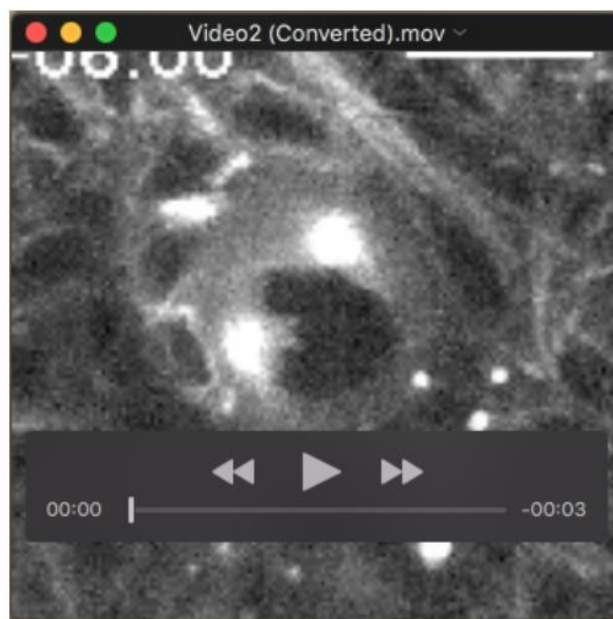
B) Western Blot showing the expression of MBD-GFP, KBD-GFP and Ensc-GFP in ovary extracts from wild type flies. The membrane was probed with anti-GFP antibodies and the three GFP-tagged variants are expressed at similar levels (left). The same membrane was stripped and probed with anti-Ensconsin antibodies raised against the KBD (middle panel). The MBD is not detected. The red arrow indicates the endogenous Ensconsin. The membrane was stripped and probed with anti-actin antibodies (right) as a loading control.

C) Wild type oocytes were permeabilized for 1 h to remove cytoplasmic protein pools (see Methods). They were then fixed and immuno-labelled with an anti-tubulin antibody (red on the left, monochrome elsewhere) and an anti-Ensconsin affinity-purified antibody (green in the left panels, monochrome elsewhere). Scale bars: 50  $\mu$ m. Note that Ensconsin is first detected in the egg chamber during early stages (top). At later stages, it co-localizes with the polarised MT network (middle panels). The right panels show an enlarged view of the MT cytoskeleton of the corresponding oocyte. During stage 10B, Ensconsin also co-localizes with the MT network involved in ooplasmic streaming (bottom panels).

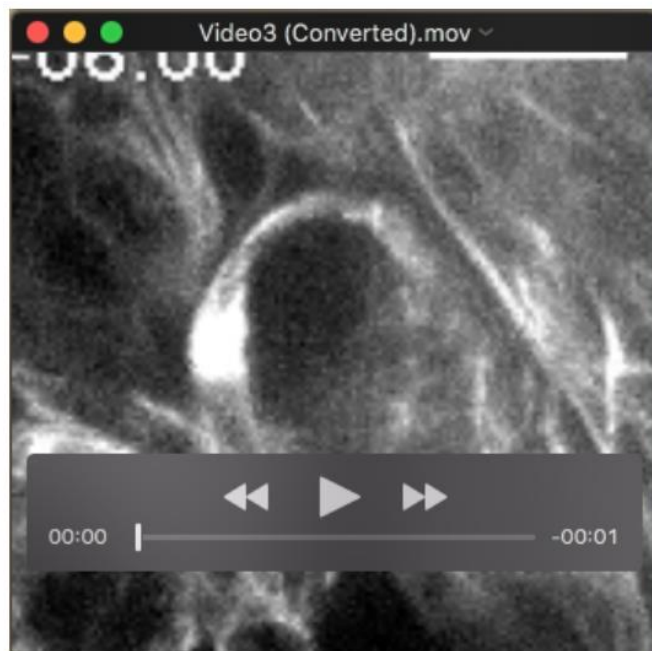
D) Selected images of a wild type embryo-expressing MBD-GFP as it divides during interphase (at 4:30, left) and during metaphase (8:00, right). E) Selected images of a wild type dividing embryo-expressing KBD-GFP, shown during prophase (1:00, left) and metaphase (4:30, right). The GFP-tagged proteins are green and RFP-tubulin is red in the merge pictures, and they are both monochrome in the other panels. Scale bars: 20  $\mu$ m. Time is indicated as min:sec. MBD-GFP co-localizes with MTs during mitosis and interphase, but KBD-GFP does not.



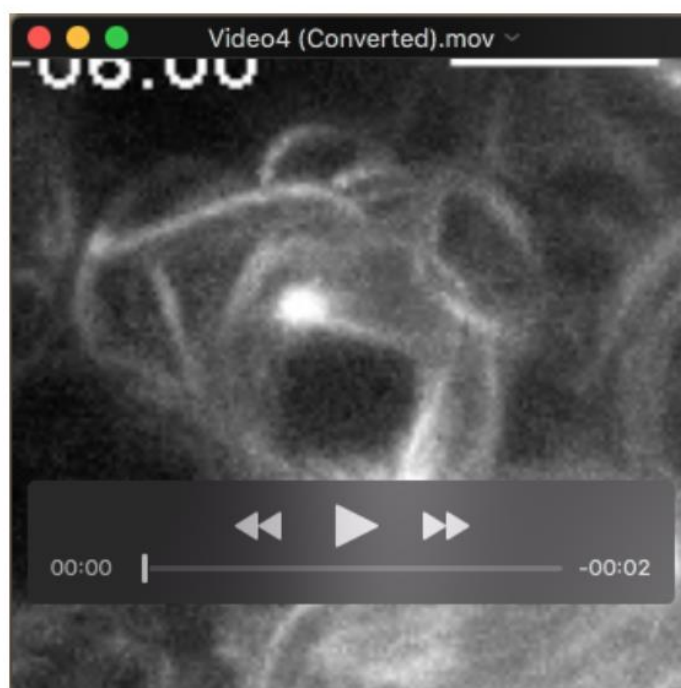
**Movie 1.** Control dividing NB expressing RFP-tubulin. Scale bar: 10  $\mu$ m. Time is min:sec.



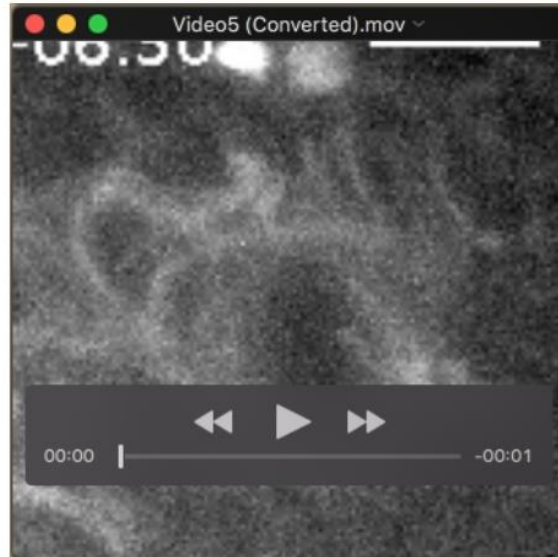
**Movie 2.** *khc*<sup>27</sup>/*khc*<sup>63</sup> mutant NB expressing RFP-tubulin. Scale bar: 10  $\mu$ m. Time is min:sec.



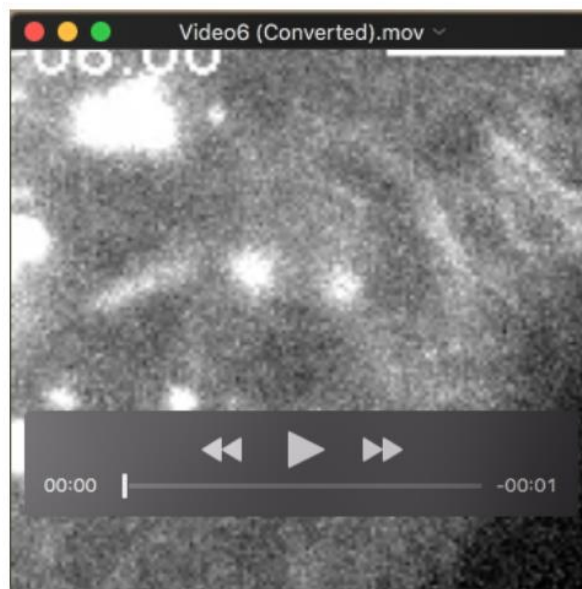
**Movie 3.** Dividing NB overexpressing Ensc-venus. Scale bar: 10  $\mu$ m. Time is min:sec.



**Movie 4.** *khc<sup>27</sup>/khc<sup>63</sup>* mutant neuroblast overexpressing Ensc-Venus during cell division. Scale bar: 10  $\mu$ m. Time is min:sec. See the rescue of the centrosome separation defect.



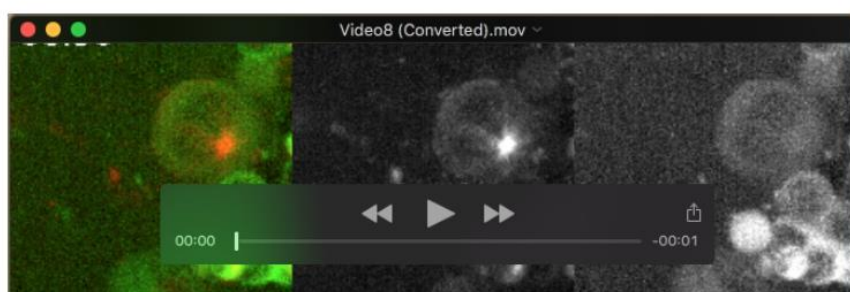
**Movie 5.** Control dividing NB expressing RFP-tubulin. Scale bar: 10  $\mu$ m. Time is min:sec.



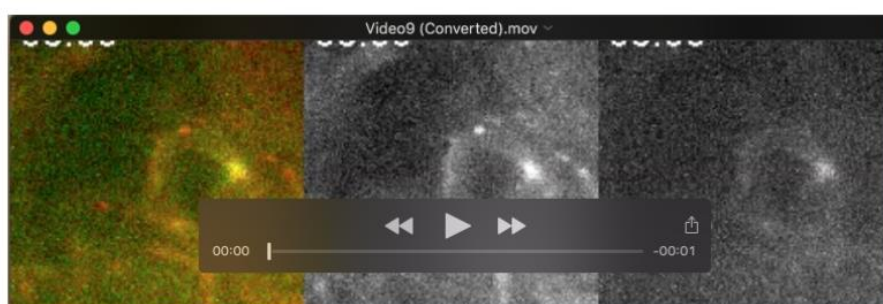
**Movie 6.** *ensc* mutant neuroblast expressing RFP-tubulin. See the centrosome separation defect. Scale bar: 10  $\mu$ m. Time is min:sec.



**Movie 7.** *ensc* mutant NB expressing RFP-tubulin (red in the merge panel and monochrome in the middle panel) and MBD-GFP (Green in the middle panel, and monochrome in the right panel). There is no rescue of the interphase centrosome separation defect. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ . Time is min:sec.



**Movie 8.** Squashed *ensc* mutant NB expressing RFP-tubulin (red in the merge panel and monochrome in the middle panel) and KBD-GFP (green in the merge panel, and monochrome in the right panel). The interphase centrosome separation defect is restored. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ . Time is min:sec.



**Movie 9.** *ensc* mutant NB expressing RFP-tubulin (red in the merge panel and monochrome in the middle panel) and full length Ensc-GFP (green in the merge panel, and monochrome in the right panel). Interphase centrosome separation is restored. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ . Time is min:sec.



## II.C Discussion

### II.C.1 Ensconsine pleine longueur est essentielle pour maintenir la taille du fuseau mitotique

Ensconsine a été identifié pour la première fois grâce à son interaction avec les microtubules (Buliski et al., 1994). Les premiers travaux ont révélé que la surexpression d'Ensconsine ne modifiaient pas la dynamique des microtubules dans les cellules humaines en interphase (Faire et al., 1999). Cependant, en 2011 une étude montre que la surexpression du domaine N-ter d'un isoforme de MAP7 (Mdp3 chez l'homme) augmente la stabilité des microtubules (Sun et al., 2011). Par la suite, de nouvelles expériences montrent que la modification des niveaux endogènes d'Ensconsine induit des défauts d'assemblage du fuseau mitotique (Bulinski et al., 1994; Gallaud et al., 2014; Mchedlishvili et al., 2018). Dans les mutants *ensc*, les Nbs ont des fuseaux mitotiques plus courts et une vitesse de polymérisation des microtubules plus faible (Gallaud et al., 2014). Nos expériences de sauvetages indiquent le transgène MBD seul n'est pas capable de stimuler la polymérisation des microtubules comme initialement supposé. Par conséquent, nos résultats suggèrent que la protéine doit être entière et que le MBD et le KBD coopèrent afin de stimuler la polymérisation des microtubules. De plus nous avons déterminé que la quantité d'Ensconsine influe sur la taille du fuseau car sa surexpression conduit à des fuseaux plus longs. Le mécanisme d'action par lequel Ensconsine stimule la polymérisation des microtubules n'est pas encore élucidé. Une analyse par microscopie TIRFF nous a permis d'obtenir plus de renseignements sur l'impact d'Ensconsine sur la dynamique des microtubules (Collaboration Isabelle Arnal, données non montrées). La présence d'Ensconsine augmente la vitesse de dépolymérisation et le nombre d'événements de sauvetages des microtubules. De plus, la vitesse de dépolymérisation et le nombre d'événements de catastrophes sont diminués. Ces expériences confortent nos résultats préliminaires et montrent que Ensconsine module la dynamique des microtubules. La création d'une nouvelle lignée transgénique exprimant une protéine Ensconsine pleine longueur avec le domaine à la kinésine-1 muté nous permettrait d'obtenir une lignée de séparation de fonction pour la polymérisation des microtubules. Par conséquent, cette nouvelle lignée transgénique exprimée dans un mutant *ensc* serait potentiellement capable de sauver la longueur des fuseaux mitotiques sans que les centrosomes soient correctement séparés. De plus, il

serait intéressant de savoir si Ensconsine est capable de s'oligomériser, ce qui pourrait expliquer la formation de ces faisceaux de microtubules obtenus après sa surexpression en interphase. Cette hypothèse pourra être testée par chromatographie d'exclusion ou une analyse au niveau moléculaire par microscopie électronique.

Une étude a montré que Ensconsine est régulée par phosphorylation au cours du cycle cellulaire (Masson and Kries, 1995). En observant la localisation d'Ensconsine au cours de la mitose, nous observons que la protéine est en partie exclue des microtubules lors de l'entrée en mitose. Cette délocalisation des microtubules d'Ensconsine pourrait être régulée par la phosphorylation de la protéine au niveau de certains sites. Chez l'homme, dix sites de phosphorylation putatifs de CDK1 et Nek2 ont été identifiés dont six dans le MBD (Nousiainen et al., 2006; Dephore et al., 2015). La phosphorylation d'Ensconsine est essentielle pour l'exclure (en partie) des microtubules avant l'entrée en mitose. Cette exclusion d'Ensconsine est essentielle afin que les microtubules dépolymérisent et puissent réorganiser leurs réseaux de microtubules afin de former le fuseau mitotique (Mchedlishvili et al., 2018). L'identification des sites de phosphorylation par spectrométrie de masse chez la drosophile et leurs mutations permettrait de créer de nouvelles lignées transgéniques. Suite à l'expression de ces transgènes dans les mutants *ensc*, nous pourrions observer l'impact d'une protéine Ensconsine non phosphorylable (constamment associé aux microtubules) ou constamment phosphorylée (exclue des microtubules) sur l'assemblage du fuseau mitotique.

### II.C.2 Le recrutement de la kinésine-1 par Ensconsine

Nous avons analysé l'impact d'Ensconsine sur le transport dépendant de la kinésine-1. Ces résultats sont en accord avec les données montrant que Ensconsine est un cofacteur essentiel de la kinésine-1 chez les drosophiles et dans les cellules musculaires de mammifères (Sung et al., 2008; Metzger et al., 2012; Barlan et al., 2013). Nous avons montré que le KBD se lie à la kinésine mais n'a pas d'affinité pour les microtubules. Ce domaine est capable de sauver la létalité et la séparation des centrosomes chez la drosophile, un processus cellulaire dépendant de la kinésine-1. Nous avons également observé une augmentation de l'affinité de la kinésine-1 pour les

microtubules en présence du domaine KBD dans les ovocytes de drosophiles et *in vitro*. En revanche, le KBD n'est pas capable de sauver la polarisation dans les ovocytes. Ce processus demande probablement un recrutement maximal de la kinésine-1 sur les microtubules. Par conséquent, on peut en conclure que selon les processus biologiques, il existe différents niveaux de recrutement nécessaires de la kinésine-1 sur les microtubules. Ces différences peuvent dépendre de la taille de la cellule ou de la distance que la kinésine-1 doit parcourir le long des microtubules.

La kinésine-1 est connue pour être auto-inhibée par des phénomènes de repliement entre le domaine moteur et le site de liaison avec le cargo. La liaison de la kinésine-1 avec un cargo lève cette auto-inhibition, ce qui permet l'interaction du domaine moteur avec le microtubule (Cai et al., 2007; Hackney and Stock, 2000; Verhey and Hammond, 2009). Un deuxième domaine d'auto-inhibition de la kinésine-1 se situe sur la tige de la kinésine-1. Ce deuxième domaine d'auto-inhibition est la région qui interagit avec le KBD d'Enscinsine. Nous proposons que le KBD d'Enscinsine interagit avec le domaine d'auto-inhibition (au niveau de la tige) de la kinésine-1. Cette interaction permettrait de lever l'auto-inhibition et permettrait à la kinésine-1 d'interagir avec les microtubules. Nous envisageons de créer une lignée exprimant une kinésine-1 mutée au niveau du site de liaison à Ensconsine afin de tester cette hypothèse. Ainsi, nous pourrions tester l'influence d'un mutant « superactif » de la kinésine-1 sur le développement des drosophiles (la séparation des centrosomes, le transport cellulaire, la viabilité ect).



### III. Conclusion générale

L'assemblage du fuseau mitotique est un événement très complexe qui organise la division cellulaire. La mitose repose sur une multitude de complexes protéiques, d'interactions protéine-protéine et de mécanismes de régulation (Walczak et Heald, 2008). À ce jour, de nombreuses protéines associées aux microtubules et jouant un rôle dans l'assemblage du fuseau mitotique ont été identifiées et caractérisées dans différents organismes tel que la drosophile (Hughes et al., 2008), le xénope (Gache et al., 2010) et l'homme (Torres et al., 2011).

Les deux protéines identifiées auxquelles s'est intéressée l'équipe ne sont pas nouvelles. En revanche, leurs fonctions sont différentes de ce qui est décrit dans la littérature. dTBCE semble exercer un rôle supplémentaire de sa fonction de chaperonne. Elle régule un mécanisme mal compris, l'import de tubuline soluble dans l'espace nucléaire après la NEBD. Ensconsine possède un rôle clé dans l'assemblage du fuseau mitotique en contrôlant sa longueur. Nous pouvons spéculer que les nombreux cribles protéomiques ont permis de mettre en évidence tous les acteurs de l'assemblage du fuseau mitotique. En revanche, la caractérisation de ces protéines est très incomplète. Par conséquent, de nombreuses études restent à faire pour comprendre la fonction réelle de toutes les MAPs impliquées dans l'assemblage du fuseau mitotique.

Parmi toutes les MAPs, certaines d'entre elles sont liées à des maladies humaines. Pour la protéine TBCE, une délétion de quatre acides aminés dans le domaine CAP-Gly provoque un syndrome héréditaire qui se manifeste par une hypoparathyroïdie, un retard mental et un dysmorphisme facial (HRD) (Parvari et al., 2002). La famille de la kinésines-1 est aussi associée à quelques formes connues de maladies neuro-dégénératives. Par exemple, la perte de fonction de la mutation KIF5A entraîne une forme héréditaire de paraplégie spastique, un ensemble de maladies rares qui affectent le système nerveux central (Reid et al., 2002; Solowska and Baas, 2015). Comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces protéines permettrait de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin d'éventuellement d'aider les patients atteints de maladies génétiques liées à ces MAPs.



## **Annexe**

**Manuscrit soumis à JCS**

**A novel benzodiazepine derivative that suppresses Mt dynamics and impairs mitotic progression**

*Vittoria Pirani<sup>1,2</sup>, Mathieu Metivier<sup>1</sup>, Siou Ku<sup>1</sup>, Denis Chretien<sup>1</sup>, Robeta Ettari<sup>3</sup>, Regis Gier<sup>1</sup>,  
Lorenzo Corsi<sup>2\*</sup>, Christelle Benaud<sup>1\*</sup>*

1- Institut de Génétique et Développement IGDR, CNRS UMR 6290 CNRS – UR1, Faculté de Médecine, 2 avenue du Professeur Léon Bernard, CS 34317, 35043 Rennes Cedex, France

2- Dept. Life Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy

3- Dept. of Chemical, Biological, Pharmaceutical and environmental Sciences, University of Messina, Messina, Italy

\* co-Corresponding Author: [christelle.benaud@univ-rennes1.fr](mailto:christelle.benaud@univ-rennes1.fr),

[lorenzo.corsi@unimore.it](mailto:lorenzo.corsi@unimore.it)

**Running title:** A novel anti-mitotic 2,3 benzodiazepine derivative

**Key words:** microtubules, mitosis, anti-mitotic drug, microtubule dynamics, SAC

Word number: 2298

## Abstract

Developing new drugs is essential to overcome cancer cells resistance to current chemotherapy compounds. Herein, we describe a novel 2,3-benzodiazepine-4 derivative, named *1g* with antimitotic properties. We show that it perturbs the formation of a functional mitotic spindle, inducing a spindle assembly checkpoint (SAC)-dependent arrest in human cells. Live analysis of individual microtubules indicates that *1g* promotes an immediate but reversible reduction in microtubule growth during interphase and mitosis. Unlike most anti-mitotic compounds, *1g* does not interfere directly with tubulin, nor perturbs microtubules assembly *in vitro*. Interestingly, *1g* also triggers a SAC-dependent mitotic delay associated with chromosome segregation in the *Drosophila* neural stem cells *in vivo* model, suggesting it targets a conserved microtubules regulation module in human and flies. Altogether, our results indicate that we have identified a novel promising antimitotic drug with the unique properties to inhibit microtubules dynamicity.

## Introduction

Microtubules are composed of alpha and beta tubulin heterodimers whose assembly is highly dynamic, undergoing stochastic phases of growth and shrinkage, a process called dynamic instability (1). The microtubule network serves diverse and specific functions in differentiated cells such as scaffold and cargo transport. As the cell proceeds through mitosis, the microtubule network undergoes a dramatic reorganization to build a mitotic spindle used to segregate chromatids in the two daughter cells. *In vivo*, microtubules nucleation, organization as well as their intrinsic dynamic instability properties are regulated by microtubule-associated proteins (MAPS). The influence of these MAPs on the dynamic assembly of microtubules contributes to the microtubules assembly patterns required for the proper formation of the mitotic spindle (2,3).

The dynamic properties of mitotic spindle microtubules are required for fast and amphitelic attachment of sister kinetochores to the opposite spindle poles, an event essential to avoid missegregation of chromatids during anaphase and subsequent aneuploidy. In case of erroneous attachments of chromosomes to spindle MTs, the spindle assembly checkpoint (SAC) remains unsatisfied and inhibits anaphase onset through inhibition of the Anaphase Promoting Complex/Cyclosome (APC/C). Cells are then delayed in mitosis until all defective attachments have been corrected (4).

The central role of microtubule in orchestrating cell division together with the property of mitotic cells to be delayed by a SAC-dependent activation have made microtubules a target of choice for cancer chemotherapeutic agents aiming to block cell division (5). Microtubules binding substances that block microtubule dynamic, such as Vinka alkaloid and taxanes, have emerged as efficient anti-tumor agents and are currently used in therapeutic treatments. However, their use leads to severe side effects including neuropathy. Moreover, between tumors a variability in the response to the

treatment with these compounds is observed. The identification of new anti-mitotic drugs with alternative modes of actions thus remains a priority for anti-cancer research (6).

Activation of the AMPA receptor by glutamate has long been known to enhance cell proliferation (7). A recent screen to identify new anti-proliferative compounds has highlighted the non-competitive AMPA receptor agonist derivative 1-(4-amino-3, 5-dimethylphenyl)-3,5-dihydro-7,8-ethylenedioxy-4 h-2,3-benzodiazepin-4-one (called here after *1g*) as a potent novel growth inhibitor (8). Upon treatment with *1g*, human leukemia T cells accumulate with a 2N DNA content, suggesting an arrest of cells at the G2/M phase of the cell cycle. In the current study, we have thus evaluated the potential of *1g* as a novel promising and efficient anti-mitotic drug with a unique effect on MT dynamicity.

## **Results and discussion**

### ***1g* arrests cells in mitosis**

A previous study has indicated that *1g* induces an accumulation of Jurka cells at the G2/M phase of the cell cycle (8). To confirm the effect of *1g* on the proliferation of transformed human epithelial cells, we followed an asynchronous population of Hela cells by phase contrast time-lapse microscopy for 20hrs (Fig.1a; sup. movies 1 and 2). Control cells progressively rounded up to enter mitosis, divided and spread back down over this period of time, increasing the total number of cells. On the contrary, cells treated with *1g* similarly rounded up, but no cell division was observed, suggesting that cells remained arrested in the early phases of mitosis, and were unable to progress into anaphase and complete their division. This progressive accumulation of rounded cells

was observable in a dose dependent manner with an optimal *1g* concentration of 2.5 $\mu$ M (Fig. 1b).

To evaluate whether cells treated with *1g* display a cell division defect, we synchronized Hela cells at the G2/M transition using the CDK1 kinase inhibitor RO3306 (9), then released them in presence of DMSO (control) or *1g* and followed their progression through mitosis (Fig. 1c and 1d). Their mitotic stage was defined by staining the cells for tubulin and DNA. As expected, control cells reached the metaphase-anaphase transition within 45 min and 92% of the cells were in telophase at 90 min post-release. In contrast, only 19% of cells treated within 2 $\mu$ M *1g* had passed the metaphase-anaphase transition, and none of the dividing cells exposed to 5  $\mu$ M *1g* had reached anaphase by 90min. Indeed, dividing *1g* treated cells remained in prometaphase, displaying an abnormal mitotic spindle (Fig. 1c-lower right panel). Furthermore, whereas control cells were able to fully congress their chromosomes to the metaphase plate cells within 45 min (Fig. 1c and e), cells treated with *1g* displayed major congression defects. This failure to establish a metaphase plate was associated with the detection of the SAC component BUBR1 on the kinetochore in agreement with an activation of the spindle assembly checkpoint (Fig. 1e).

To confirm that the accumulation of rounded cells observed by phase contrast in the asynchronous cell population treated with *1g* (Fig. 1a) was indeed due to the activation of the SAC making the cells unable to exit mitosis, Hela cells were treated with *1g* alone or with *1g* in combination with the SAC inhibitor AZ3146 (10), and followed by videomicroscopy. In presence of AZ3146, *1g* treated cells progressively rounded up, but unlike cells treated with *1g* alone, proceeded through a defective anaphase-telophase and spread back down. It is interesting to note that these cells displayed no cytosolic sign of cell death throughout the 16hrs of the treatment with both inhibitors (Fig. 1f and

sup movies 3 and 4). This data therefore indicates that *1g* impacts cell proliferation via mitotic arrest and not direct cell death. However, prolonged mitotic arrest has been shown to result in subsequent cell death (11,12) explaining the previously described apoptotic effect of the *1g* compound observed after 24hrs and mostly 48hrs of treatment (8). All together these experiments demonstrate that treatment of proliferating HeLa cells with *1g* activates the SAC, arresting the cells in prometaphase of the cell cycle.

### ***1g* disrupts the formation of the mitotic spindle**

The disorganized mitotic spindle observed in *1g* treated cells, prompted us to further characterize the dynamics of the mitotic spindle assembly. To that purpose, we imaged by spinning microscopy live HeLa cells expressing GFP-tubulin after their release from the CDK1 inhibitor induced G2/M arrest (Fig. 2a, sup. movies 5, 6 and 7). Control cells treated with DMSO separated their spindle poles within 20 min and built a fully formed bipolar metaphasic spindle within 45 min. In cells treated with low *1g* concentrations (1 to 2  $\mu$ M) spindle poles also formed and separated to some extent, with new microtubules starting to grow from both poles. However, centrosomes did not nucleate long microtubule arrays and cells did not manage to form a full size functional mitotic spindle. A decrease of 25% (1  $\mu$ M *1g*) and 37% (2  $\mu$ M *1g*) in the spindle poles distance was observed (Fig. 2b). At higher concentration of *1g* (2.5-5  $\mu$ M), multisite microtubule nucleation could be observed and the microtubule growth from centrosomes was strongly reduced (Fig. 2a -arrow heads). No bipolar mitotic spindle was formed. Visualization of the centrosomes, using HeLa cells expressing the centriolar protein centrin-GFP, confirmed that some microtubule nucleation emanated from the two centrosomes. However, the additional small asters observed did not contain centrin-GFP, indicating that *1g* did not trigger centrosome amplification (Fig. 2c). In addition, the

defect in centrosome separation was further accentuated (5 $\mu$ M vs. 1 $\mu$ M and 2 $\mu$ M 1*g*), with a 64% decrease in distance between centrosomes in cells treated with 5 $\mu$ M 1*g* as compared to DMSO treated cells (Fig. 2d). The formation of shorter microtubules observed in presence of 1*g* most likely accounts for the reduced centrosome separation, since centrosome separation is a microtubule dependent process occurring in prophase and prometaphase (13).

### **1*g* alters microtubule growth in cells**

The dynamic properties of microtubules are crucial for the extensive remodeling of interphase arrays of microtubules into a mitotic bipolar spindle (2). We thus investigated whether 1*g* interferes with microtubule polymerization. We first performed a depolymerization-repolymerization type of assay (Fig. 3a). The microtubule network of interphase cells was depolymerized at 4°C in presence or absence of 1*g*. We then followed the dynamics of microtubules regrowth as the samples were incubated at 37°C. Long newly formed microtubules could be observed 5 min after the temperature switch in control cells, and extensive microtubule repolymerization was present after 10 min. Presence of 1*g* did not affect cold induced depolymerization of microtubules, indicating that 1*g* does not act as a microtubule stabilizing agent (Fig. 3a t=0-and f). Indeed, in presence of stabilizing agents, such as taxan, cold resistant microtubules bundles can be detected (11). However, 1*g* markedly slowed down the dynamics of the microtubule network reformation (fig 3a t=5,10 and 15min). Only short and fragmented microtubules were observed in 1*g* treated cells in the first 10 min, and it required 30 min to polymerize a microtubule network equivalent to the one formed after 15 min in control cells.

The microtubule +tip protein EB1 has been commonly used to image and quantify microtubule growth and dynamic instability (14). To further investigate and quantify the effect of *1g* on microtubule dynamics, we imaged HeLa cells expressing EB1-GFP by spinning disk confocal microscopy at 1 sec time intervals before and immediately after addition of *1g* or DMSO (Fig. 3b and sup. movies 8,9). Results are illustrated as time projections and kymographs (time vs. distance). In control HeLa cells, measurements of EB1 comets dynamic indicated a microtubules growth speed of  $13,44 \pm 0,83 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$ . Whereas addition of DMSO in control cells did not significantly alter microtubule growth length, nor growth speed, *1g* treatment resulted in 37% decrease in mean growth length (from  $1.23 \pm 0.2 \mu\text{m}$  to  $0,78 \pm 0.04 \mu\text{m}$  in  $2.5 \mu\text{M}$  *1g*) (Fig. 3 b and d) and 25% decrease in mean growth speed (from  $13.3 \pm 0.6$  to  $10.1 \pm 0.5 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$  in  $2.5 \mu\text{M}$  *1g*) (Fig. 3c and e). Furthermore, the initial microtubule growth pattern (before treatment, Fig. 3b,c) was recovered shortly after drug removal (washout, Fig. 3b,c) indicating that the action of *1g* is reversible ( $1.3 \pm 0.1 \mu\text{m}$  and  $15.3 \pm 1.2 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$  for growth speed and length respectively)(Fig. 3b and c, panels and sup. Movies 8,9). We thus clearly observed a slowdown in microtubules polymerization in interphase cells. Altogether, these data indicate that *1g* is able to promote a fast and reversible inhibition of MT growth during interphase and mitosis.

To assess whether the *1g* compound targets directly the tubulin polymer, we tested the impact of *1g* on microtubule self-assembly *in vitro*. We performed turbidity assays (15) using purified tubulin in presence of a range of *1g* concentrations (Fig. 3f). Absorbance at 350 nm, which is directly proportional to the amount of MT polymers formed, revealed no significant difference when tubulin is incubated in polymerizing buffer at 37° C in presence of *1g* or DMSO. In addition, no significant formation of aggregates was detected when the temperature was shifted back to 0°C, the average

absorbance going back to the base line for all samples. The absence of significant alteration in tubulin polymer assembly, or of formation of aggregates indicates that 1g does not interfere with microtubule self-assembly directly.

### **1g interferes with cell division in tissue**

During the last decades, *Drosophila Melanogaster* has emerged as an interesting model to identify new genes required for cell division as well as for cancer research (16). To explore *in vivo* the effect of the 1g compound on cell division, we have thus examined the impact of the drug on neural stem cells (neuroblasts) division, in the developing brain of drosophila larvae. Third instar larval brain expressing RFP-tubulin and H2A-GFP were dissected, cultured in Schneider medium containing either DMSO or various concentrations of 1g and dividing neuroblasts imaged with a spinning disk microscope (Fig. 4a). Control neuroblasts formed bipolar spindles and started to segregate their chromosomes  $5.9 \pm 0.4$  min after the nuclear envelope break down (NEBD). In contrast mitosis duration was significantly increased in a dose-dependent manner in presence of 1g ( $6.1 \pm 0.6$  min for 5 $\mu$ M treatment,  $8.2 \pm 0.6$  min for 10 $\mu$ M treatment and to  $10.9 \pm 3.1$  min for 20 $\mu$ M treatment (Fig 4d), suggesting an activation of the SAC. In agreement with SAC activation, 1g treated neuroblasts exhibited dose-dependent mitotic spindle-assembly defects (5 $\mu$ M: 35,3%, 10 $\mu$ M: 100% of neuroblasts) (Fig. 4b). In addition, lagging chromatids were frequently observed in 31,3% (n=6/17) and 68,4 % (n=13/19) of the neuroblasts treated respectively with 10 and 20 $\mu$ M of 1g (Fig. 4c).

We here show that the anti-proliferative effect of 1g in cancer cell lines observed previously (8) is caused by impairment of mitotic spindle assembly that causes SAC

activation and mitotic delay. We further show that this effect is caused by interference with microtubule polymerization.

Notably, we do not observe major alterations in the overall architecture of the interphase microtubules network in *1g* treated cells, suggesting that this compound may not induce the secondary effects observed with other anti-microtubule agents. As cells proceed from interphase to mitosis there is a 10 fold increase in the turnover rate of microtubules (2,3) which is required for the reorganization of the microtubule network into a mitotic spindle. The effect of *1g* is most likely amplified in mitosis thereby impeding the correct formation of mitotic spindle. Our *in vitro* polymerization assays with pure tubulins indicate that *1g* does not directly target the intrinsic microtubule polymerization dynamics. This is in agreement with the hypothesis that *1g* would rather target an essential MAP involved in the regulation of microtubule growth during interphase and mitosis. Strikingly, the mitotic phenotypes observed in fly neural stem cells (multiple asters) are very similar, suggesting that *1g* target is conserved between human and flies. Further studies will be needed to identify the direct cellular target of *1g* in order to obtain further insight on its mechanism of action.

Interestingly, fly neuroblasts display severe missegregation of chromosome and aneuploidy. Studies aiming to understand the mode of action of taxanes in tumors have revealed that it may be more efficient for a drug to promote chromosome mis-segregation than a strong block in mitotic progression (17,18). All together our study indicates that the *1g* compound acts as a promising novel anti-mitotic drug with unique properties.

### **Conflict of interest**

The content of this manuscript is included in a current patent application

## Acknowledgement

The imaging work was performed on the platform MRic-Photonics (SFR Biosit). *1g* was synthesized by Robeta Ettari (University of Messina, Italy). We thank Thibault Courtheoux for his help with the use of plus Tip Tracker software and Laurent Richard-Parpaillon for critical discussion. Vittoria Pirani was financed by Erasmus program. Christelle Benaud is supported by INSERM. This work was supported by the CNRS, the University of Rennes 1, La ligue Régionale Contre le Cancer (Grand Ouest-Bretagne).

Supplementary Information is available on *Oncogene's* website (<http://www.nature.com/onc>)

## References

1. Mitchison T, Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*. 1984 Nov;312(5991):237–42.
2. Desai A, Mitchison TJ. Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1997;13:83–117.
3. Prosser SL, Pelletier L. Mitotic spindle assembly in animal cells: a fine balancing act. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017 Mar;18(3):187–201.
4. Khodjakov A, Rieder CL. The nature of cell-cycle checkpoints: facts and fallacies. *J Biol*. 2009;8(10):88.
5. Janssen A, Medema RH. Mitosis as an anti-cancer target. *Oncogene*. 2011 Jun;30(25):2799–809.
6. Dumontet C, Jordan MA. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Oct;9(10):790–803.
7. Stepulak A, Rola R, Polberg K, Ikonomidou C. Glutamate and its receptors in cancer. *J Neural Transm (Vienna)*. 2014 Aug;121(8):933–44.
8. Parenti S, Casagrande G, Montanari M, Espahbodinia M, Ettari R, Grande A, et al. A novel 2,3-benzodiazepine-4-one derivative AMPA antagonist inhibits G2/M transition and induces apoptosis in human leukemia Jurkat T cell line. *Life Sci*. 2016 May;152:117–25.

9. Vassilev LT. Cell cycle synchronization at the G2/M phase border by reversible inhibition of CDK1. *Cell Cycle*. 2006 Nov;5(22):2555–6.
10. Tipton AR, Ji W, Sturt-Gillespie B, Bekier ME2, Wang K, Taylor WR, et al. Monopolar spindle 1 (MPS1) kinase promotes production of closed MAD2 (C-MAD2) conformer and assembly of the mitotic checkpoint complex. *J Biol Chem*. 2013 Dec;288(49):35149–58.
11. Stanton RA, Gernert KM, Nettles JH, Aneja R. Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective. *Med Res Rev*. 2011 May;31(3):443–81.
12. Brito DA, Rieder CL. Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint. *Curr Biol*. 2006 Jun;16(12):1194–200.
13. Wittmann T, Hyman A, Desai A. The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nat Cell Biol*. 2001 Jan;3(1):E28–34.
14. Matov A, Applegate K, Kumar P, Thoma C, Krek W, Danuser G, et al. Analysis of microtubule dynamic instability using a plus-end growth marker. *Nat Methods*. 2010 Sep;7(9):761–8.
15. Gallaud E, Caous R, Pascal A, Bazile F, Gagne J-P, Huet S, et al. Ensconsin/Map7 promotes microtubule growth and centrosome separation in *Drosophila* neural stem cells. *J Cell Biol*. 2014 Mar;204(7):1111–21.
16. Gonzalez C. *Drosophila melanogaster*: a model and a tool to investigate malignancy and identify new therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2013 Mar;13(3):172–83.
17. Shi J, Mitchison TJ. Cell death response to anti-mitotic drug treatment in cell culture, mouse tumor model and the clinic. *Endocr Relat Cancer*. 2017 Mar.
18. Weaver BA. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell*. 2014 Sep;25(18):2677–81.

### Figure Legends

#### **Figure 1: 1g arrests proliferating cells in prometaphase and activates the spindle assembly checkpoint.**

**a-** Proliferation of HeLa cells treated with DMSO or 1g (5μM) was monitored by imaging asynchronous cells for 16 and 20hrs with Leica DMIRB (obj. 20X dry) scale bar=30μm (full sequence in supp. movies 1 and 2). **b-** Dose response

effect of *1g* on cell proliferation. Phase contrast images of HeLa cells treated with the indicated concentration of *1g* for 12hrs. scale bar=30 $\mu$ m. c- *1g* treated cells arrest in pro-metaphase. Cells synchronized at the G2-M transition with the CDK1 inhibitor RO 3306 were released in the presence of DMSO or the indicated concentration of *1g* for 45min (metaphase in control cells) or 90min (telophase in control). Cells are stained for  $\alpha$ -tubulin (antibody clone YL1/2, Millipore) in green or DNA (Hoechst 33342, Invitrogen) in blue. scale bar=10 $\mu$ m. d-Quantification of the repartition of the cells in the different phases of mitosis in presence of increasing concentration of *1g* (n>100 cells). e- HeLa cells synchronized at the G2/M transition were released in presence of DMSO or 5 $\mu$ M *1g* for 45 min. Z stack projections (DeltaVision microscope) of cells stained for the presence at the kinetochore of the spindle assembly check point protein BUBR1 (anti-BUBR1 clone 9 BD bioscience) and DNA (Hoechst). scale bar=5 $\mu$ m. f- Activation of the SAC arrest *1g* treated cells in prometaphase. Live phase contrast imaging of proliferating asynchronous HeLa cells treated with 5 $\mu$ M *1g* alone or in combination with 2 $\mu$ M Mps1 inhibitor (AZ3146, calbiochem). Images acquired every 5min for 16hrs on Leica DMIRB. scale bar=30 $\mu$ m. (full sequence in sup. movies 3 and 4).

**Figure 2: *1g* interferes with mitotic spindle assembly in dividing cells.** Spinning disk confocal images (Max projection) of HeLa tubulin GFP cells undergoing mitosis in presence of DMSO, 1 $\mu$ M or 2,5 $\mu$ M *1g*. Scale bar=10 $\mu$ m. (full sequence in sup. movies 5,6 and7). b-Analysis of the distance between spindle poles, 45 min after the G2/M block release in cells treated with DMSO or 1 $\mu$ M and 2 $\mu$ M of *1g*. n $\geq$ 40 cells. c-HeLa centrin-GFP cells synchronized at the G2/M transition were released for 45 min in presence of DMSO or 5 $\mu$ M *1g* and stained for tubulin, GFP and DNA. DeltaVision deconvoluted projections,

scale bar=5μm. d- Analysis of centrosome separation in cells treated with DMSO or 5μM 1g. n≥49 cells. Measurement performed with the Image J software. Student t-test, \*\*\*\*P<0.0001.

**Figure 3: 1g alters microtubules growth in cells.** a-Microtubules of HeLa cells treated with DMSO or 5μM 1g were depolymerized at 4°C and allowed to repolymerize by switching back the cells to 37°C for the indicated times. Z stack projection of DeltaVision acquired images of cells stained for α-tubulin. b- Spinning disk time lapse images of HeLa EB1-GFP cells (1 image/sec) before treatment, in presence of DMSO or 2,5μM 1g, and after washing out the drug (control: movie 8; 1g: movie 9). Time projection of EB1-GFP over 1 min are presented for the different conditions. c-Kymograph (time (sec) vs distance) representations of the EB1 tracks over 1 min. Scale bar=1μm. Quantification (plus Tip Tracker software) of EB1 comets life time (d-) and velocity (e-). For each condition n≥700 tracks in 10 (control) to 15 (1g) independent measurements. \*\*\*\*P<.0001, Student's t-test. f- *In vitro* microtubule polymerization assay. DMSO (ctl) or 5 and 10 μM 1g was added to purified porcine brain tubulin in polymerization buffer at 4°C. The formation of microtubule polymers was monitored by the absorbance at 350nm as the temperature was increased to 35°C. Formation of stable aggregates are visualized as temperature is shifted back to 4°C.

**Figure 4: Effect of 1g on *Drosophila* neuroblasts proliferation.**

Fly brains expressing tubulin-RFP and Histone H2B-GFP were dissected in a and the neural stem cells of the central brain were imaged by spinning disk confocal microscopy as described previously (Gallaud et al., 2014). a- Selected frames of dividing *Drosophila*

larval neuroblasts incubated with DMSO or 10 $\mu$ M 1*g*. Time 00:00 (min:sec) corresponds to the nuclear envelop break down (NEB). Dotted circle outlines the neuroblast cell contour. Scale bar: 10 $\mu$ m. b-Analysis of the percentage of mitotic spindle assembly defects in control neuroblasts (DMSO) and neuroblasts treated with 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M of 1*g*.  $n \geq 17$  cells for each condition. c- Analysis of chromosomes segregation defects corresponding to lagging chromosomes in control and 1*g* treated brains.  $n \geq 17$  cells. In C and D, the blue and pink bar represents normal and defective cells. d- Analysis of mitosis duration measured from NEB to anaphase onset in neuroblasts exposed to DMSO (05:92 $\pm$ 0,53,  $n=19$ ), 5 $\mu$ M (06:15 $\pm$ 0,81,  $n=17$ ), 10 $\mu$ M (08:24 $\pm$ 0,79,  $n=17$ ), 20 $\mu$ M (11,00 $\pm$ 4,36,  $n=19$ ) 1*g*. \* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 1,3 \times 10^{-4}$  (Wilcoxon test).

**Figure1**

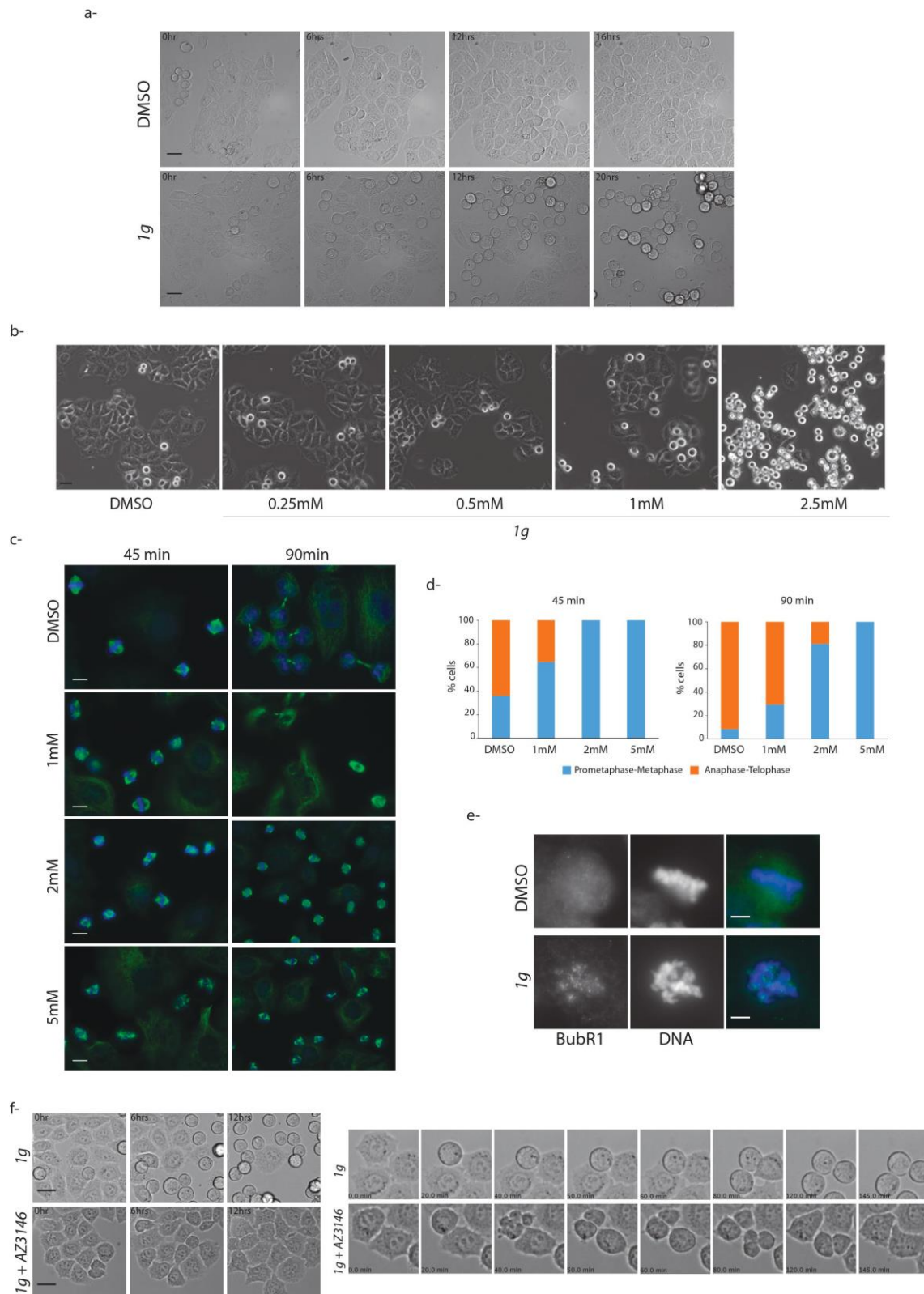
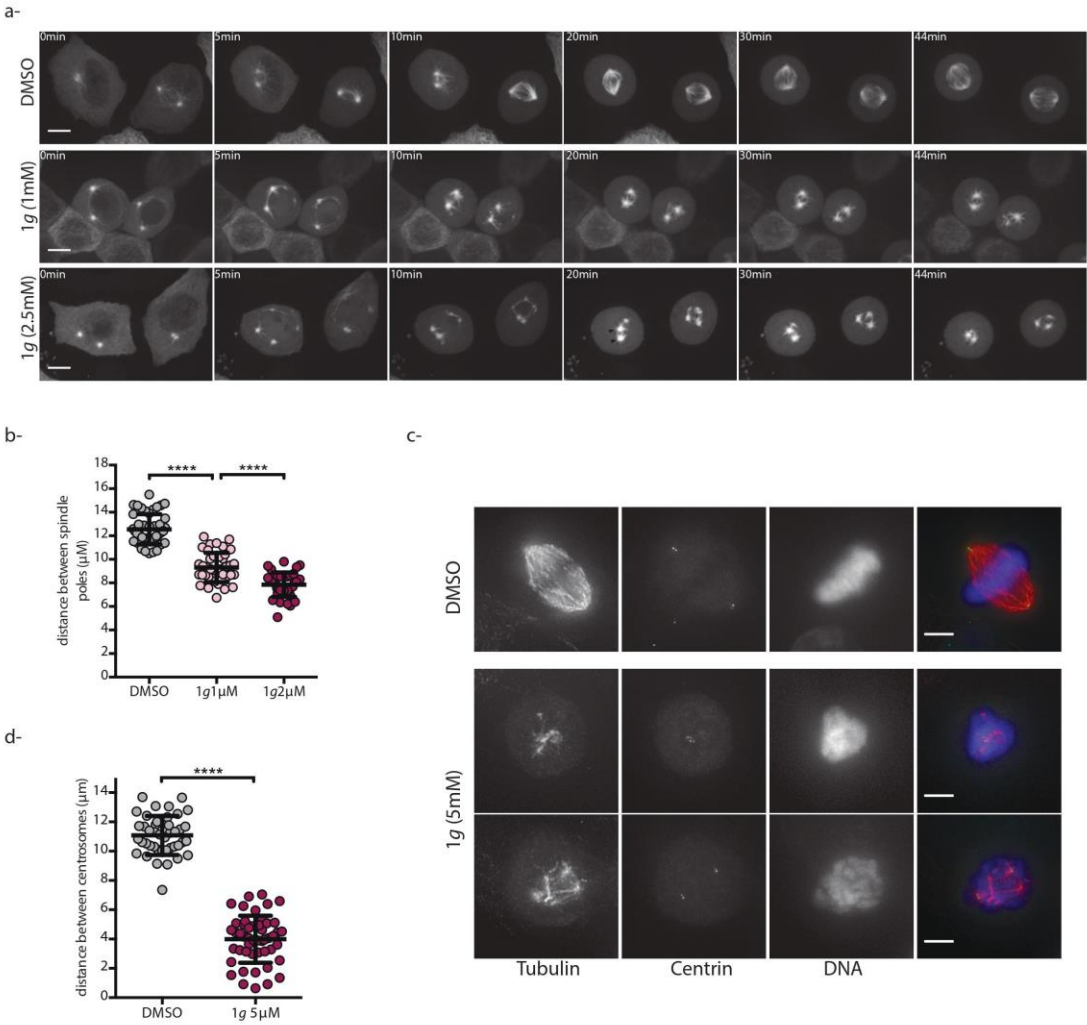
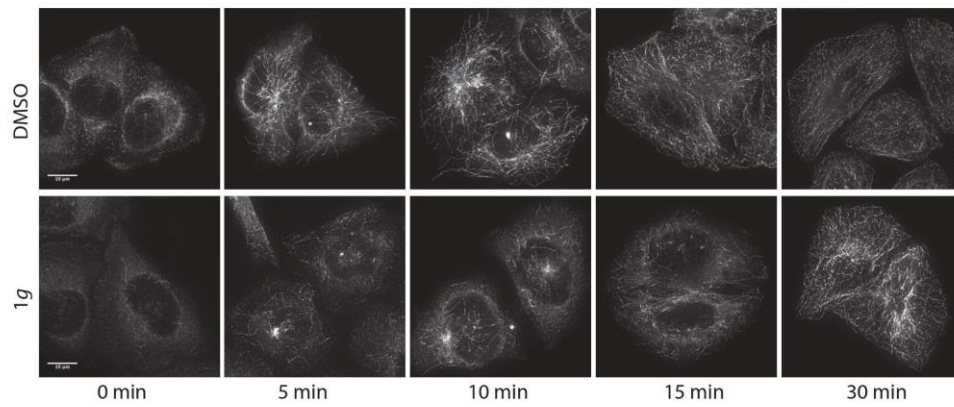


Figure 2

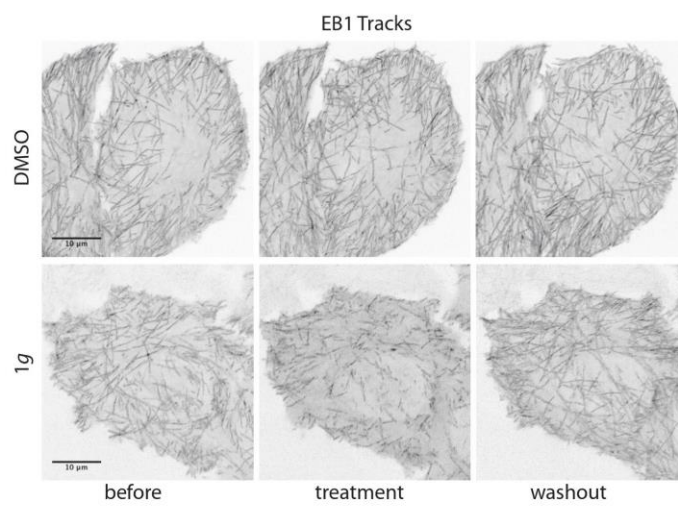


**Figure 3**

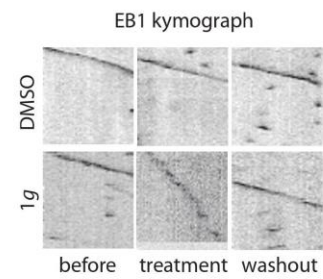
a-



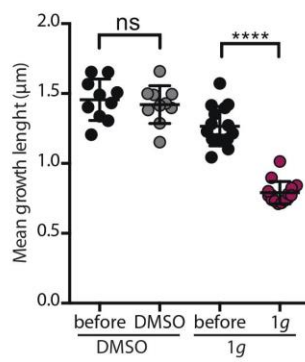
b-



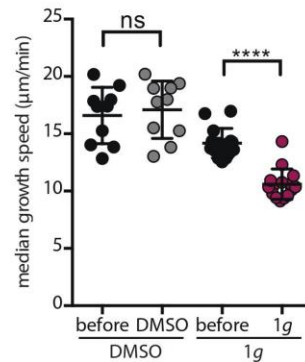
c-



d-



e-



f-

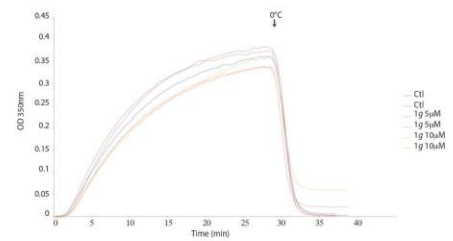
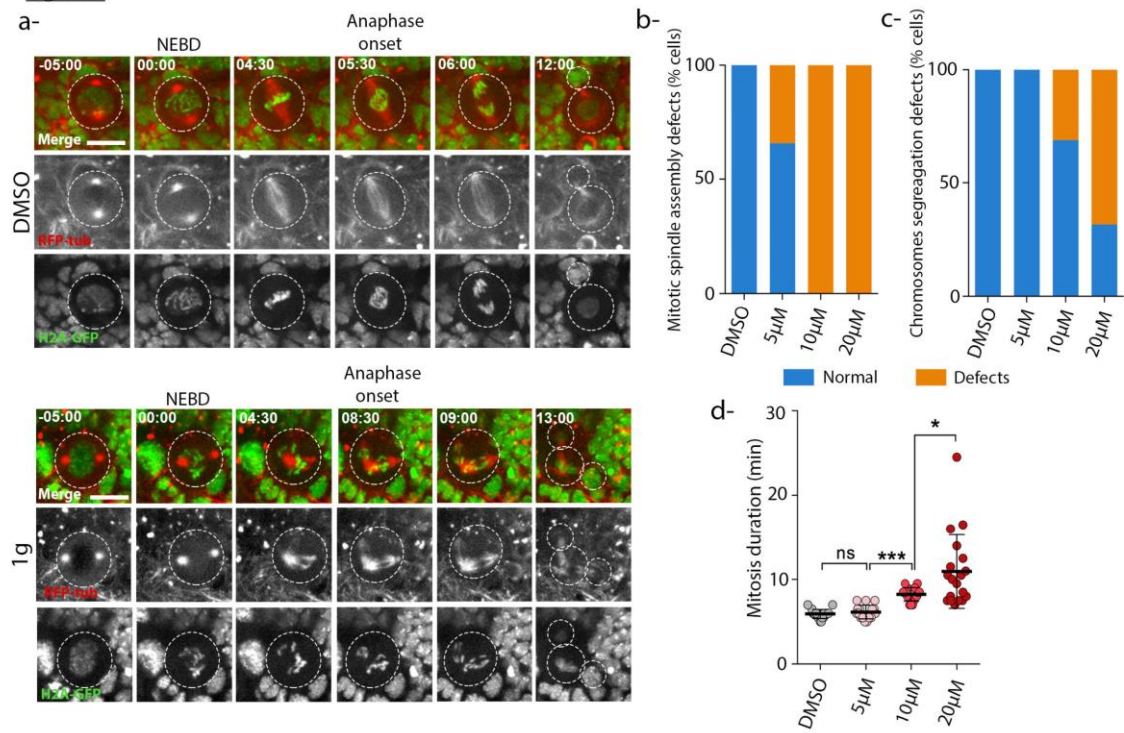


Figure 4





## RÉFÉRENCES



- Aillaud, Chrystelle, Christophe Bosc, Leticia Peris, Anouk Bosson, Pierre Heemeryck, Juliette Van Dijk, Julien Le Friec, et al. "Vasohibins/SVBP Are Tubulin Carboxypeptidases (TCPs) That Regulate Neuron Differentiation." *Science* 358, no. 6369 (December 15, 2017): 1448–53.
- Al-Bassam, Jawdat, and Fred Chang. "Regulation of Microtubule Dynamics by TOG-Domain Proteins XMAP215/Dis1 and CLASP." *Trends in Cell Biology* 21, no. 10 (October 2011): 604–14.
- Al-Bassam, Jawdat. "Revisiting the Tubulin Cofactors and Arl2 in the Regulation of Soluble A $\beta$ -Tubulin Pools and Their Effect on Microtubule Dynamics." Edited by William Bement. *Molecular Biology of the Cell* 28, no. 3 (February 1, 2017): 359–63.
- Albee, Alison J., Wei Tao, and Christiane Wiese. "Phosphorylation of Maskin by Aurora-A Is Regulated by Ran GTP and Importin  $\beta$ ." *Journal of Biological Chemistry* 281, no. 50 (December 15, 2006): 38293–301.
- Alfieri, Claudio, Leifu Chang, Ziguo Zhang, Jing Yang, Sarah Maslen, Mark Skehel, and David Barford. "Molecular Basis of APC/C Regulation by the Spindle Assembly Checkpoint." *Nature* 536, no. 7617 (August 2016): 431–36.
- Alushin, Gregory M., Gabriel C. Lander, Elizabeth H. Kellogg, Rui Zhang, David Baker, and Eva Nogales. "High-Resolution Microtubule Structures Reveal the Structural Transitions in A $\beta$ -Tubulin upon GTP Hydrolysis." *Cell* 157, no. 5 (May 2014): 1117–29.
- Anders, Andreas, and Kenneth E. Sawin. "Microtubule Stabilization in Vivo by Nucleation-Incompetent  $\gamma$ -Tubulin Complex." *Journal of Cell Science* 124, no. 8 (2011): 1207–1213.
- Antoshechkin, Igor, and Min Han. "The C. Elegans Evl-20 Gene Is a Homolog of the Small GTPase ARL2 and Regulates Cytoskeleton Dynamics during Cytokinesis and Morphogenesis." *Developmental Cell* 2, no. 5 (2002): 579–591.
- Arnal, Isabelle, Claire Heichette, Georgios S. Diamantopoulos, and Denis Chrétien. "CLIP-170/Tubulin-Curved Oligomers Coassemble at Microtubule Ends and Promote Rescues." *Current Biology* 14, no. 23 (2004): 2086–2095.
- Aumeier, Charlotte, Laura Schaedel, Jérémie Gaillard, Karin John, Laurent Blanchoin, and Manuel Théry. "Self-Repair Promotes Microtubule Rescue." *Nature Cell Biology* 18 (September 12, 2016): 1054.
- Bakhoun, Samuel F., Giulio Genovese, and Duane A. Compton. "Deviant Kinetochore Microtubule Dynamics Underlie Chromosomal Instability." *Current Biology* 19, no. 22 (December 2009): 1937–42.
- Banjade, Sudeep, and Michael K Rosen. "Phase Transitions of Multivalent Proteins Can Promote Clustering of Membrane Receptors." Edited by Anthony A Hyman. *ELife* 3 (October 16, 2014): e04123.
- Barisic, Marin, Ricardo Silva e Sousa, Suvranta K. Tripathy, Maria M. Magiera, Anatoly V. Zaytsev, Ana L. Pereira, Carsten Janke, Ekaterina L. Grishchuk, and Helder Maiato. "Microtubule Detyrosination Guides Chromosomes during Mitosis." *Science* 348, no. 6236 (2015): 799–803.
- Barlan, Kari, Wen Lu, and Vladimir I. Gelfand. "The Microtubule-Binding Protein Ensconsin Is an Essential Cofactor of Kinesin-1." *Current Biology* 23, no. 4 (February 2013): 317–22.
- Bartolini, F. "Identification of a Novel Tubulin-Destabilizing Protein Related to the Chaperone Cofactor E." *Journal of Cell Science* 118, no. 6 (February 22, 2005): 1197–1207.

- Basto, Renata, Joyce Lau, Tatiana Vinogradova, Alejandra Gardiol, C. Geoffrey Woods, Alexey Khodjakov, and Jordan W. Raff. "Flies without Centrioles." *Cell* 125, no. 7 (June 2006): 1375–86.
- Bayliss, Richard, Teresa Sardon, Isabelle Vernos, and Elena Conti. "Structural Basis of Aurora-A Activation by TPX2 at the Mitotic Spindle." *Molecular Cell* 12, no. 4 (October 1, 2003): 851–62.
- Beaudouin, Joël, Daniel Gerlich, Nathalie Daigle, Roland Eils, and Jan Ellenberg. "Nuclear Envelope Breakdown Proceeds by Microtubule-Induced Tearing of the Lamina." *Cell* 108, no. 1 (2002): 83–96.
- Bellouze, S., M. K. Schafer, D. Buttigieg, G. Baillat, C. Rabouille, and G. Haase. "Golgi Fragmentation in Pmn Mice Is Due to a Defective ARF1/TBCE Cross-Talk That Coordinates COPI Vesicle Formation and Tubulin Polymerization." *Human Molecular Genetics* 23, no. 22 (November 15, 2014): 5961–75.
- Belmont, L.D., A.A. Hyman, K.E. Sawin, and T.J. Mitchison. "Real-Time Visualization of Cell Cycle-Dependent Changes in Microtubule Dynamics in Cytoplasmic Extracts." *Cell* 62, no. 3 (August 10, 1990): 579–89.
- Berezniuk, I., H.T. Vu, P.J. Lyons, J.J. Sironi, H. Xiao, B. Burd, M. Setou, R.H. Angeletti, K. Ikegami, and L.D. Fricker. 2012. Cytosolic carboxypeptidase1 is involved in processing  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin. *J. Biol. Chem.* 287:6503–6517.
- Bettencourt-Dias, Mónica, and David M. Glover. "Centrosome Biogenesis and Function: Centrosomics Brings New Understanding." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, no. 6 (June 2007): 451–63.
- Bieling, Peter, Stefanie Kandels-Lewis, Ivo A. Telley, Juliette van Dijk, Carsten Janke, and Thomas Surrey. "CLIP-170 Tracks Growing Microtubule Ends by Dynamically Recognizing Composite EB1/Tubulin-Binding Sites." *The Journal of Cell Biology* 183, no. 7 (December 29, 2008): 1223–33.
- Blower, Michael D., Maxence Nachury, Rebecca Heald, and Karsten Weis. "A Rae1-Containing Ribonucleoprotein Complex Is Required for Mitotic Spindle Assembly." *Cell* 121, no. 2 (April 2005): 223–34.
- Bobinnec, Y., A. Khodjakov, L.M. Mir, C.L. Rieder, B. Eddé, and M. Bornens. 1998. Centriole disassembly in vivo and its effect on centrosome structure and function in vertebrate cells. *J. Cell Biol.* 143:1575–1589.
- Bömmel, Heike, Gang Xie, Wilfried Rossoll, Stefan Wiese, Sibylle Jablonka, Thomas Boehm, and Michael Sendtner. "Missense Mutation in the *Tubulin-Specific Chaperone E (Tbce)* Gene in the Mouse Mutant *Progressive Motor Neuronopathy*, a Model of Human Motoneuron Disease." *The Journal of Cell Biology* 159, no. 4 (November 25, 2002): 563–69.
- Booth, Christopher R, Anne S Meyer, Yao Cong, Maya Topf, Andrej Sali, Steven J Ludtke, Wah Chiu, and Judith Frydman. "Mechanism of Lid Closure in the Eukaryotic Chaperonin TRiC/CCT." *Nature Structural & Molecular Biology* 15, no. 7 (July 2008): 746–53.
- Bringmann, H. "A Kinesin-like Motor Inhibits Microtubule Dynamic Instability." *Science* 303, no. 5663 (March 5, 2004): 1519–22.
- Brouhard, Gary J., and Luke M. Rice. "The Contribution of  $\alpha\beta$ -Tubulin Curvature to Microtubule Dynamics." *The Journal of Cell Biology* 207, no. 3 (November 10, 2014): 323–34.
- Brouhard, Gary J., Jeffrey H. Stear, Tim L. Noetzel, Jawdat Al-Bassam, Kazuhisa Kinoshita, Stephen C. Harrison, Jonathon Howard, and Anthony A. Hyman. "XMAP215 Is a Processive Microtubule Polymerase." *Cell* 132, no. 1 (January 2008): 79–88.

- Bucciarelli, Elisabetta, Maria Grazia Giansanti, Silvia Bonaccorsi, and Maurizio Gatti. "Spindle Assembly and Cytokinesis in the Absence of Chromosomes during 993–99. Bulinski, J. Chloë, David J. Odde, Bonnie J. Howell, Ted D. Salmon, and Clare M. Waterman-Storer. "Rapid Dynamics of the Microtubule Binding of Ensconsin in Vivo." *Journal of Cell Science* 114, no. 21 (2001): 3885–3897.
- Cai, Q., P.-Y. Pan, and Z.-H. Sheng. "Syntabulin-Kinesin-1 Family Member 5B-Mediated Axonal Transport Contributes to Activity-Dependent Presynaptic Assembly." *Journal of Neuroscience* 27, no. 27 (July 4, 2007): 7284–96.
- Cai, Shang, Christopher B. O'Connell, Alexey Khodjakov, and Claire E. Walczak. "Chromosome Congression in the Absence of Kinetochore Fibres." *Nature Cell Biology* 11, no. 7 (July 2009): 832–38.
- Carazo-Salas, Rafael E., Giulia Guarguaglini, Oliver J. Gruss, Alexandra Segref, Eric Karsenti, and Iain W. Mattaj. "Generation of GTP-Bound Ran by RCC1 Is Required for Chromatin-Induced Mitotic Spindle Formation." *Nature* 400, no. 6740 (July 1999): 178–81.
- Carazo-Salas, Rafael E., Oliver J. Gruss, Iain W. Mattaj, and Eric Karsenti. "Ran-GTP Coordinates Regulation of Microtubule Nucleation and Dynamics during Mitotic-Spindle Assembly." *Nature Cell Biology* 3, no. 3 (March 2001): 228–34.
- Carmena, Mar, Michael Wheelock, Hironori Funabiki, and William C. Earnshaw. "The Chromosomal Passenger Complex (CPC): From Easy Rider to the Godfather of Mitosis." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (November 23, 2012): 789.
- Cassimeris, Lynne, and Justin Morabito. "TOGp, the Human Homolog of XMAP215/Dis1, Is Required for Centrosome Integrity, Spindle Pole Organization, and Bipolar Spindle Assembly." *Molecular Biology of the Cell* 15, no. 4 (April 1, 2004): 1580–90.
- Cassimeris, Lynne. "The Oncoprotein 18/Stathmin Family of Microtubule Destabilizers." *Current Opinion in Cell Biology* 14, no. 1 (February 1, 2002): 18–24.
- Cavazza, Tommaso, and Isabelle Vernos. "The RanGTP Pathway: From Nucleo-Cytoplasmic Transport to Spindle Assembly and Beyond." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 3 (January 11, 2016).
- Cesario, J., and K. S. McKim. "RanGTP Is Required for Meiotic Spindle Organization and the Initiation of Embryonic Development in *Drosophila*." *Journal of Cell Science* 124, no. 22 (November 15, 2011): 3797–3810.
- Chan, Gordon K., Song-Tao Liu, and Tim J. Yen. "Kinetochore Structure and Function." *Trends in Cell Biology* 15, no. 11 (November 2005): 589–98.
- Chatel, Guillaume, and Birthe Fahrenkrog. "Nucleoporins: Leaving the Nuclear Pore Complex for a Successful Mitosis." *Cellular Signalling* 23, no. 10 (October 1, 2011): 1555–62.
- Chauvin, Stéphanie, and André Sobel. "Neuronal Stathmins: A Family of Phosphoproteins Cooperating for Neuronal Development, Plasticity and Regeneration." *Progress in Neurobiology* 126 (March 2015): 1–18.
- Chrétien, D., F. Metoz, Fulvia Verde, E. Karsenti, and R. H. Wade. "Lattice Defects in Microtubules: Protofilament Numbers Vary within Individual Microtubules." *The Journal of Cell Biology* 117, no. 5 (1992): 1031–1040.
- Civelekoglu-Scholey, Gul, Li Tao, Ingrid Brust-Mascher, Roy Wollman, and Jonathan M. Scholey. "Prometaphase Spindle Maintenance by an Antagonistic Motor-Dependent Force Balance Made Robust by a Disassembling Lamin-B Envelope." *The Journal of Cell Biology* 188, no. 1 (January 11, 2010): 49–68.

- Cleveland, D. W., K. Yamanaka, and P. Bomont. "Gigaxonin Controls Vimentin Organization through a Tubulin Chaperone-Independent Pathway." *Human Molecular Genetics* 18, no. 8 (January 27, 2009): 1384–94.
- Cleveland, Don W, Yinghui Mao, and Kevin F Sullivan. "Centromeres and Kinetochores: From Epigenetics to Mitotic Checkpoint Signaling." *Cell* 112, no. 4 (February 21, 2003): 407–21.
- Cole, D. G., W. M. Saxton, K. B. Sheehan, and J. M. Scholey. "A 'Slow' Homotetrameric Kinesin-Related Motor Protein Purified from *Drosophila* Embryos." *Journal of Biological Chemistry* 269, no. 37 (September 16, 1994): 22913–16.
- Cole, D. G., W. M. Saxton, K. B. Sheehan, and J. M. Scholey. "A 'Slow' Homotetrameric Kinesin-Related Motor Protein Purified from *Drosophila* Embryos." *Journal of Biological Chemistry* 269, no. 37 (September 16, 1994): 22913–16.
- Conduit, Paul T., Alan Wainman, and Jordan W. Raff. "Centrosome Function and Assembly in Animal Cells." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16, no. 10 (September 16, 2015): 611–24.
- Cooper, Jeremy R, Michael Wagenbach, Charles L Asbury, and Linda Wordeman. "Catalysis of the Microtubule On-Rate Is the Major Parameter Regulating the Depolymerase Activity of MCAK." *Nature Structural & Molecular Biology* 17, no. 1 (January 2010): 77–82.
- Cowan NJ, Lewis SA (2001). Type II chaperonins prefoldin, and the tubulin-specific chaperones. *Adv Protein Chem* 59, 73-104
- Cross, Marie K., and Maureen A. Powers. "Nup98 Regulates Bipolar Spindle Assembly through Association with Microtubules and Opposition of MCAK." Edited by Yixian Zheng. *Molecular Biology of the Cell* 22, no. 5 (March 2011): 661–72.
- Cullen, C. Fiona, Peter Deák, David M. Glover, and Hiroyuki Ohkura. "Mini Spindles." *The Journal of Cell Biology* 146, no. 5 (1999): 1005–1018.
- De Groot, Christian O., Ilian Jelesarov, Fred F. Damberger, Saša Bjelić, Martin A. Schäfer, Neel S. Bhavesh, Ilia Grigoriev, et al. "Molecular Insights into Mammalian End-Binding Protein Heterodimerization." *Journal of Biological Chemistry* 285, no. 8 (February 19, 2010): 5802–14.
- De Simone, Alessandro, François Nédélec, and Pierre Gönczy. "Dynein Transmits Polarized Actomyosin Cortical Flows to Promote Centrosome Separation." *Cell Reports* 14, no. 9 (March 2016): 2250–62.
- De Souza, Colin P., and Stephen A. Osmani. "Double Duty for Nuclear Proteins – the Price of More Open Forms of Mitosis." *Trends in Genetics* 25, no. 12 (December 2009): 545–54.
- DeLuca, Jennifer G., Walter E. Gall, Claudio Ciferri, Daniela Cimini, Andrea Musacchio, and E.D. Salmon. "Kinetochore Microtubule Dynamics and Attachment Stability Are Regulated by Hec1." *Cell* 127, no. 5 (December 2006): 969–82.
- Dephoure, N., C. Zhou, J. Villen, S. A. Beausoleil, C. E. Bakalarski, S. J. Elledge, and S. P. Gygi. "A Quantitative Atlas of Mitotic Phosphorylation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, no. 31 (August 5, 2008): 10762–67.
- Desai, Arshad, and Timothy J. Mitchison. "MICROTUBULE POLYMERIZATION DYNAMICS." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 13, no. 1 (November 1, 1997): 83–117.
- Ding, Yun, Changfu Yao, Mariana Lince-Faria, Uttama Rath, Weili Cai, Helder Maiato, Jack Girton, Kristen M. Johansen, and Jørgen Johansen. "Chromator Is Required for Proper Microtubule Spindle Formation and Mitosis in *Drosophila*." *Developmental Biology* 334, no. 1 (October 2009): 253–63.

- Domnitz, Sarah B., Michael Wagenbach, Justin Decarreau, and Linda Wordeman. "MCAK Activity at Microtubule Tips Regulates Spindle Microtubule Length to Promote Robust Kinetochore Attachment." *The Journal of Cell Biology* 197, no. 2 (2012): 231–237.
- Drechsel, David N., and Marc W. Kirschner. "The Minimum GTP Cap Required to Stabilize Microtubules." *Current Biology* 4, no. 12 (December 1994): 1053–61.
- Dumont, Julien, Sebastian Petri, Franz Pellegrin, Marie-Emilie Terret, Markus T. Bohnsack, Pascale Rassinier, Virginie Georget, Petr Kalab, Oliver J. Gruss, and Marie-Hélène Verlhac. "A Centriole- and RanGTP-Independent Spindle Assembly Pathway in Meiosis I of Vertebrate Oocytes." *The Journal of Cell Biology* 176, no. 3 (January 29, 2007): 295–305.
- Dumont, Sophie, and Timothy J. Mitchison. "Force and Length in the Mitotic Spindle." *Current Biology* 19, no. 17 (September 2009): R749–61.
- Edvardson, Shimon, Guoling Tian, Hayley Cullen, Hannah Vanyai, Linh Ngo, Saiuj Bhat, Adi Aran, et al. "Infantile Neurodegenerative Disorder Associated with Mutations in *TBCD*, an Essential Gene in the Tubulin Heterodimer Assembly Pathway." *Human Molecular Genetics*, August 29, 2016, ddw292.
- Ems-McClung, Stephanie C, Yixian Zheng, and Claire E Walczak. "Importin  $\alpha$  and Ran-GTP Regulate XCTK2 Microtubule Binding through a Bipartite Nuclear Localization Signal." *Molecular Biology of the Cell* 15 (2004): 12.
- Ems-McClung, Stephanie C., and Claire E. Walczak. "Kinesin-13s in Mitosis: Key Players in the Spatial and Temporal Organization of Spindle Microtubules." *Molecular Motors in Mitosis* 21, no. 3 (May 1, 2010): 276–82.
- Eyers, Patrick A., and James L. Maller. "Regulation of *Xenopus* Aurora A Activation by TPX2." *Journal of Biological Chemistry* 279, no. 10 (March 5, 2004): 9008–15.
- Faruki, Shamsa, Richard W. Cole, and Conly L. Rieder. "Separating Centrosomes Interact in the Absence of Associated Chromosomes during Mitosis in Cultured Vertebrate Cells." *Cell Motility and the Cytoskeleton* 52, no. 2 (June 2002): 107–21.
- Feng, Z., Caballe, A., Wainman, A., Johnson, S., Haensele, A. F. M., Cottee, M. A., Conduit, P. T., Lea, S. M., and Raff, J. W. (2017) Structural Basis for Mitotic Centrosome Assembly in Flies. *Cell* 169:1078–1089.e13.
- Feng, Zhe, Anna Caballe, Alan Wainman, Steven Johnson, Andreas F.M. Haensele, Matthew A. Cottee, Paul T. Conduit, Susan M. Lea, and Jordan W. Raff. "Structural Basis for Mitotic Centrosome Assembly in Flies." *Cell* 169, no. 6 (June 2017): 1078–1089.e13.
- Ferenz, Nick P., Alyssa Gable, and Pat Wadsworth. "Mitotic Functions of Kinesin-5." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21, no. 3 (May 2010): 255–59.
- Ferreira, Jorge G., António J. Pereira, Anna Akhmanova, and Helder Maiato. "Aurora B Spatially Regulates EB3 Phosphorylation to Coordinate Daughter Cell Adhesion with Cytokinesis." *The Journal of Cell Biology* 201, no. 5 (May 27, 2013): 709–24.
- Fleming, James A, Leticia R Vega, and Frank Solomon. "Function of Tubulin Binding Proteins in Vivo," 2000 n.d., 12.
- Fong, K.-W., Choi, Y.-K., Rattner, J. B., and Qi, R. Z. (2008) CDK5RAP2 Is a Pericentriolar Protein That Functions in Centrosomal Attachment of the gamma-Tubulin Ring Complex. *Mol. Biol. Cell* 19, 115–125.
- Forbes, Douglass J, Anna Travesa, Matthew S Nord, and Cyril Bernis. "Nuclear Transport Factors: Global Regulation of Mitosis." *Current Opinion in Cell Biology* 35 (August 2015): 78–90.

- Francis, Joshua W., Rachel E. Turn, Laura E. Newman, Cara Schiavon, and Richard A. Kahn. "Higher Order Signaling: ARL2 as Regulator of Both Mitochondrial Fusion and Microtubule Dynamics Allows Integration of 2 Essential Cell Functions." *Small GTPases* 7, no. 4 (October 2016): 188–96.
- Fu, Jingyan, and David M. Glover. "Structured Illumination of the Interface between Centriole and Peri-Centriolar Material." *Open Biology* 2, no. 8 (August 2012): 120104.
- Furuta, Ken'ya, and Yoko Yano Toyoshima. "Minus-End-Directed Motor Ncd Exhibits Processive Movement That Is Enhanced by Microtubule Bundling In Vitro." *Current Biology* 18, no. 2 (January 2008): 152–57.
- Gache, Vincent, Patrice Waridel, Christof Winter, Aurelie Juhem, Michael Schroeder, Andrej Shevchenko, and Andrei V. Popov. "Xenopus Meiotic Microtubule-Associated Interactome." Edited by Nils Cordes. *PLoS ONE* 5, no. 2 (February 17, 2010): e9248.
- Gadea, Bedrick B., and Joan V. Ruderman. "Aurora B Is Required for Mitotic Chromatin-Induced Phosphorylation of Op18/Stathmin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, no. 12 (2006): 4493–4498.
- Gallaud, Emmanuel, Renaud Caous, Aude Pascal, Franck Bazile, Jean-Philippe Gagné, Sébastien Huet, Guy G. Poirier, Denis Chrétien, Laurent Richard-Parpaillon, and Régis Giet. "Ensconsin/Map7 Promotes Microtubule Growth and Centrosome Separation in *Drosophila* Neural Stem Cells." *The Journal of Cell Biology* 204, no. 7 (March 31, 2014): 1111–21.
- Garcia, Miguel Angel, Leah Vardy, Nirada Koonrugsa, and Takashi Toda. "Fission Yeast Ch-TOG/XMAP215 Homologue Alp14 Connects Mitotic Spindles with the Kinetochore and Is a Component of the Mad2-Dependent Spindle Checkpoint." *The EMBO Journal* 20, no. 13 (2001): 3389–3401.
- Gergely, F., C. Karlsson, I. Still, J. Cowell, J. Kilmartin, and J. W. Raff. "The TACC Domain Identifies a Family of Centrosomal Proteins That Can Interact with Microtubules." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, no. 26 (December 19, 2000): 14352–57.
- Ghenoiu, Cristina, Michael S. Wheelock, and Hironori Funabiki. "Autoinhibition and Polo-Dependent Multisite Phosphorylation Restrict Activity of the Histone H3 Kinase Haspin to Mitosis." *Molecular Cell* 52, no. 5 (December 2013): 734–45.
- Gönczy, Pierre, Silke Pichler, Matthew Kirkham, and Anthony A. Hyman. "Cytoplasmic Dynein Is Required for Distinct Aspects of Mtoc Positioning, Including Centrosome Separation, in the One Cell Stage *Caenorhabditis Elegans* Embryo." *The Journal of Cell Biology* 147, no. 1 (October 4, 1999): 135–50.
- Goodwin, Sarah S., and Ronald D. Vale. "Patronin Regulates the Microtubule Network by Protecting Microtubule Minus Ends." *Cell* 143, no. 2 (October 2010): 263–74.
- Goshima, Gohta, François Nédélec, and Ronald D. Vale. "Mechanisms for Focusing Mitotic Spindle Poles by Minus End-Directed Motor Proteins." *The Journal of Cell Biology* 171, no. 2 (October 24, 2005): 229–40.
- Goshima, Gohta, Mirjam Mayer, Nan Zhang, Nico Stuurman, and Ronald D. Vale. "Augmin: A Protein Complex Required for Centrosome-Independent Microtubule Generation within the Spindle." *The Journal of Cell Biology* 181, no. 3 (May 5, 2008): 421–29.
- Goshima, Gohta, Roy Wollman, Nico Stuurman, Jonathan M. Scholey, and Ronald D. Vale. "Length Control of the Metaphase Spindle." *Current Biology* 15, no. 22 (November 2005): 1979–88.

- Goshima, Gohta, Roy Wollman, Sarah S. Goodwin, Nan Zhang, Jonathan M. Scholey, Ronald D. Vale, and Nico Stuurman. "Genes Required for Mitotic Spindle Assembly in *Drosophila* S2 Cells." *Science* 316, no. 5823 (2007): 417–421.
- Grill, Stephan W., Jonathon Howard, Erik Schäffer, Ernst HK Stelzer, and Anthony A. Hyman. "The Distribution of Active Force Generators Controls Mitotic Spindle Position." *Science* 301, no. 5632 (2003): 518–521.
- Grønborg, Sabine, Lotte Risom, Jakob Ek, Karen Bonde Larsen, David Scheie, Yanko Petkov, Vibeke André Larsen, Morten Dunø, Fróði Joensen, and Elsebet Østergaard. "A Faroese Founder Variant in TBCD Causes Early Onset, Progressive Encephalopathy with a Homogenous Clinical Course." *European Journal of Human Genetics* 26, no. 10 (October 2018): 1512–20.
- Gruss, Oliver J., Malte Wittmann, Hideki Yokoyama, Rainer Pepperkok, Thomas Kufer, Herman Silljé, Eric Karsenti, Iain W. Mattaj, and Isabelle Vernos. "Chromosome-Induced Microtubule Assembly Mediated by TPX2 Is Required for Spindle Formation in HeLa Cells." *Nature Cell Biology* 4, no. 11 (November 2002): 871–79.
- Gruss, Oliver J., Rafael E. Carazo-Salas, Christoph A. Schatz, Giulia Guarguaglini, Jürgen Kast, Matthias Wilm, Nathalie Le Bot, Isabelle Vernos, Eric Karsenti, and Iain W. Mattaj. "Ran Induces Spindle Assembly by Reversing the Inhibitory Effect of Importin  $\alpha$  on TPX2 Activity." *Cell* 104, no. 1 (2001): 83–93.
- Guesdon, Audrey, Franck Bazile, Rubén M. Buey, Renu Mohan, Solange Monier, Ruddi Rodríguez García, Morgane Angevin, et al. "EB1 Interacts with Outwardly Curved and Straight Regions of the Microtubule Lattice." *Nature Cell Biology* 18, no. 10 (October 2016): 1102–8.
- Gupta, K. K., C. Li, A. Duan, E. O. Alberico, O. V. Kim, M. S. Alber, and H. V. Goodson. "Mechanism for the Catastrophe-Promoting Activity of the Microtubule Destabilizer Op18/Stathmin." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, no. 51 (December 17, 2013): 20449–54.
- Hagan, Iain, and Mitsuhiro Yanagida. "Novel Potential Mitotic Motor Protein Encoded by the Fission Yeast Cut7+ Gene." *Nature* 347, no. 6293 (October 1990): 563–66.
- Hagan, Iain, and Mitsuhiro Yanagida. "Novel Potential Mitotic Motor Protein Encoded by the Fission Yeast Cut7+ Gene." *Nature* 347, no. 6293 (October 1990): 563–66.
- Hammond, Jennetta W., Chun-Fang Huang, Stefanie Kaech, Catherine Jacobson, Gary Banker, and Kristen J. Verhey. "Posttranslational Modifications of Tubulin and the Polarized Transport of Kinesin-1 in Neurons." Edited by Erika Holzbaur. *Molecular Biology of the Cell* 21, no. 4 (February 15, 2010): 572–83.
- Hannak, Eva, and Rebecca Heald. "Xorbit/CLASP Links Dynamic Microtubules to Chromosomes in the *Xenopus* Meiotic Spindle." *The Journal of Cell Biology* 172, no. 1 (January 2, 2006): 19–25.
- Hannak, Eva, Karen Oegema, Matthew Kirkham, Pierre Gönczy, Bianca Habermann, and Anthony A. Hyman. "The Kinetically Dominant Assembly Pathway for Centrosomal Asters in *Caenorhabditis Elegans* Is  $\gamma$ -Tubulin Dependent." *The Journal of Cell Biology* 157, no. 4 (2002): 591–602.
- Hayashi, Hanako, Kenji Kimura, and Akatsuki Kimura. "Localized Accumulation of Tubulin during Semi-Open Mitosis in the *Caenorhabditis Elegans* Embryo." *Molecular Biology of the Cell* 23, no. 9 (2012): 1688–1699.
- Heald, Rebecca, Régis Tournéize, Thiemo Blank, Raphael Sandaltzopoulos, Peter Becker, Anthony Hyman, and Eric Karsenti. "Self-Organization of Microtubules into Bipolar Spindles around Artificial Chromosomes in *Xenopus* Egg Extracts." *Nature* 382, no. 6590 (August 1, 1996): 420–25.

- Helferich, Anika M., Sarah J. Brockmann, Jörg Reinders, Dhruva Deshpande, Karlheinz Holzmann, David Brenner, Peter M. Andersen, et al. "Dysregulation of a Novel MiR-1825/TBCB/TUBA4A Pathway in Sporadic and Familial ALS." *Cellular and Molecular Life Sciences*, July 20, 2018.
- Hentrich, Christian, and Thomas Surrey. "Microtubule Organization by the Antagonistic Mitotic Motors Kinesin-5 and Kinesin-14." *The Journal of Cell Biology* 189, no. 3 (May 3, 2010): 465–80.
- Hershkovitz, Eli, Ilia Rozin, Yehuda Limony, Haim Golan, Nurit Hadad, Rafael Gorodischer, and Rachel Levy. "Hypoparathyroidism, Retardation, and Dysmorphism Syndrome: Impaired Early Growth and Increased Susceptibility to Severe Infections Due to Hyposplenism and Impaired Polymorphonuclear Cell Functions." *Pediatric Research* 62, no. 4 (October 2007): 505–9.
- Hestermann, Andrea, and Ralph Gräf. "The XMAP215-Family Protein DdCP224 Is Required for Cortical Interactions of Microtubules." *BMC Cell Biology* 5, no. 1 (2004): 24.
- Hirata, Dai, Hirohisa Masuda, Mark Eddison, and Takashi Toda. "Essential Role of Tubulin-Folding Cofactor D in Microtubule Assembly and Its Association with Microtubules in Fission Yeast." *The EMBO Journal* 17, no. 3 (1998): 658–666.
- Honnappa, Srinivas, Susana Montenegro Gouveia, Anke Weisbrich, Fred F. Damberger, Neel S. Bhavesh, Hatim Jawhari, Ilya Grigoriev, et al. "An EB1-Binding Motif Acts as a Microtubule Tip Localization Signal." *Cell* 138, no. 2 (July 2009): 366–76.
- Hooikaas, Peter Jan, Maud Martin, Tobias Mühlethaler, Gert-Jan Kuijntjes, Cathelijn A.E. Peeters, Eugene A. Katrukha, Luca Ferrari, et al. "MAP7 Family Proteins Regulate Kinesin-1 Recruitment and Activation." *The Journal of Cell Biology* 218, no. 4 (April 1, 2019): 1298–1318.
- Howard, Jonathon, and Anthony A Hyman. "Microtubule Polymerases and Depolymerases." *Cell Structure and Dynamics* 19, no. 1 (February 1, 2007): 31–35.
- Howell, Bonnie, Niklas Larsson, Martin Gullberg, and Lynne Cassimeris. "Dissociation of the Tubulin-Sequestering and Microtubule Catastrophe-Promoting Activities of Oncoprotein 18/Stathmin." *Molecular Biology of the Cell* 10 (1999): 14.
- Hoyt, M A, T Stearns, and D Botstein. "Chromosome Instability Mutants of *Saccharomyces Cerevisiae* That Are Defective in Microtubule-Mediated Processes." *Molecular and Cellular Biology* 10, no. 1 (January 1990): 223–34.
- Hoyt, M. Andrew, Jennifer P. Macke, B. Tibor Roberts, and John R. Geiser. "Saccharomyces Cerevisiae PAC2 Functions With CIN1, 2 and 4 in a Pathway Leading to Normal Microtubule Stability." *Genetics* 146, no. 3 (1997): 849–857.
- Huang, Yuejia, Teng Li, Stephanie C. Ems-McClung, Claire E. Walczak, Claude Prigent, Xueliang Zhu, Xuemin Zhang, and Yixian Zheng. "Aurora A Activation in Mitosis Promoted by BuGZ." *The Journal of Cell Biology* 217, no. 1 (January 2, 2018): 107–16.
- Hubbert, Charlotte, Amaris Guardiola, Rong Shao, Yoshiharu Kawaguchi, Akihiro Ito, Andrew Nixon, Minoru Yoshida, Xiao-Fan Wang, and Tso-Pang Yao. "HDAC6 Is a Microtubule-Associated Deacetylase." *Nature* 417, no. 6887 (May 23, 2002): 455–58.
- Hughes, Julian R, Ana M Meireles, Katherine H Fisher, Angel Garcia, Philip R Antrobus, Alan Wainman, Nicole Zitzmann, Charlotte Deane, Hiroyuki Ohkura, and James G Wakefield. "A Microtubule Interactome: Complexes with Roles in Cell Cycle and Mitosis." Edited by Keith Gull. *PLoS Biology* 6, no. 4 (April 22, 2008): e98.

- Hülsmann, Bastian B., Aksana A. Labokha, and Dirk Görlich. "The Permeability of Reconstituted Nuclear Pores Provides Direct Evidence for the Selective Phase Model." *Cell* 150, no. 4 (August 17, 2012): 738–51.
- Inoue, Yoshihiro H., Matthew S. Savoian, Takao Suzuki, Endre Máthé, Masa-Toshi Yamamoto, and David M. Glover. "Mutations in *Orbit/Mast* Reveal That the Central Spindle Is Comprised of Two Microtubule Populations, Those That Initiate Cleavage and Those That Propagate Furrow Ingression." *The Journal of Cell Biology* 166, no. 1 (July 5, 2004): 49–60.
- Janke, Carsten. "The Tubulin Code: Molecular Components, Readout Mechanisms, and Functions." *The Journal of Cell Biology* 206, no. 4 (August 18, 2014): 461–72.
- Januschke, Jens, Louis Gervais, Sajith Dass, Julia A. Kaltschmidt, Hernan Lopez-Schier, Daniel St. Johnston, Andrea H. Brand, Siegfried Roth, and Antoine Guichet. "Polar Transport in the *Drosophila* Oocyte Requires Dynein and Kinesin I Cooperation." *Current Biology* 12, no. 23 (December 2002): 1971–81.
- Jeganathan, Karthik B., Liviu Malureanu, and Jan M. van Deursen. "The Rae1–Nup98 Complex Prevents Aneuploidy by Inhibiting Securin Degradation." *Nature* 438, no. 7070 (December 2005): 1036–39.
- Jiang, Hao, Xiaonan He, Di Feng, Xueliang Zhu, and Yixian Zheng. "RanGTP Aids Anaphase Entry through Ubr5-Mediated Protein Turnover." *The Journal of Cell Biology* 211, no. 1 (October 12, 2015): 7–18.
- Jiang, Hao, Xiaonan He, Shusheng Wang, Junling Jia, Yihan Wan, Yueju Wang, Rong Zeng, John Yates, Xueliang Zhu, and Yixian Zheng. "A Microtubule-Associated Zinc Finger Protein, BuGZ, Regulates Mitotic Chromosome Alignment by Ensuring Bub3 Stability and Kinetochore Targeting." *Developmental Cell* 28, no. 3 (February 10, 2014): 268–81.
- Jin, S., L. Pan, Z. Liu, Q. Wang, Z. Xu, and Y. Q. Zhang. "Drosophila Tubulin-Specific Chaperone E Functions at Neuromuscular Synapses and Is Required for Microtubule Network Formation." *Development* 136, no. 9 (May 1, 2009): 1571–81.
- Kaláb, Petr, Arnd Pralle, Ehud Y. Isacoff, Rebecca Heald, and Karsten Weis. "Analysis of a RanGTP-Regulated Gradient in Mitotic Somatic Cells." *Nature* 440, no. 7084 (March 2006): 697–701.
- Kalab, Petr, Karsten Weis, and Rebecca Heald. "Visualization of a Ran-GTP Gradient in Interphase and Mitotic *Xenopus* Egg Extracts." *Science* 295, no. 5564 (2002): 2452–2456.
- Kapitein, Lukas C., Erwin J. G. Peterman, Benjamin H. Kwok, Jeffrey H. Kim, Tarun M. Kapoor, and Christoph F. Schmidt. "The Bipolar Mitotic Kinesin Eg5 Moves on Both Microtubules That It Crosslinks." *Nature* 435, no. 7038 (May 2005): 114–18.
- Kapitein, Lukas C., Erwin J. G. Peterman, Benjamin H. Kwok, Jeffrey H. Kim, Tarun M. Kapoor, and Christoph F. Schmidt. "The Bipolar Mitotic Kinesin Eg5 Moves on Both Microtubules That It Crosslinks." *Nature* 435, no. 7038 (May 2005): 114–18.
- Kapoor, Tarun M., and Timothy J. Mitchison. "Eg5 Is Static in Bipolar Spindles Relative to Tubulin: Evidence for a Static Spindle Matrix." *The Journal of Cell Biology* 154, no. 6 (September 17, 2001): 1125–34.
- Karabay, A., and R. A. Walker. "Identification of Microtubule Binding Sites in the Ncd Tail Domain <sup>†</sup>." *Biochemistry* 38, no. 6 (February 1999): 1838–49.
- Karabay, A., and R.A. Walker. "The Ncd Tail Domain Promotes Microtubule Assembly and Stability." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 258, no. 1 (April 1999): 39–43.

- Karsenti, E. "Interconversion of Metaphase and Interphase Microtubule Arrays, as Studied by the Injection of Centrosomes and Nuclei into *Xenopus* Eggs." *The Journal of Cell Biology* 98, no. 5 (May 1, 1984): 1730–45.
- Katsani, Katerina R., Roger E. Karess, Nathalie Dostatni, and Valérie Doye. "In Vivo Dynamics of *Drosophila* Nuclear Envelope Components." Edited by Susan Went. *Molecular Biology of the Cell* 19, no. 9 (September 2008): 3652–66.
- Kelly, Alexander E., Srinath C. Sampath, Tapan A. Maniar, Eileen M. Woo, Brian T. Chait, and Hironori Funabiki. "Chromosomal Enrichment and Activation of the Aurora B Pathway Are Coupled to Spatially Regulate Spindle Assembly." *Developmental Cell* 12, no. 1 (January 2007): 31–43.
- Khodjakov, Alexey, Lily Copenagle, Michael B. Gordon, Duane A. Compton, and Tarun M. Kapoor. "Minus-End Capture of Preformed Kinetochore Fibers Contributes to Spindle Morphogenesis." *The Journal of Cell Biology* 160, no. 5 (March 3, 2003): 671–83.
- Kimura, Yoshishige, Nobuya Kurabe, Koji Ikegami, Koji Tsutsumi, Yoshiyuki Konishi, Oktay Ismail Kaplan, Hirofumi Kunitomo, Yuichi Iino, Oliver E. Blacque, and Mitsutoshi Setou. "Identification of Tubulin Deglutamylase among *Caenorhabditis Elegans* and Mammalian Cytosolic Carboxypeptidases (CCPs)." *Journal of Biological Chemistry* 285, no. 30 (July 23, 2010): 22936–41.
- Koffa, Maria D., Claudia M. Casanova, Rachel Santarella, Thomas Köcher, Matthias Wilm, and Iain W. Mattaj. "HURP Is Part of a Ran-Dependent Complex Involved in Spindle Formation." *Current Biology* 16, no. 8 (April 18, 2006): 743–54.
- Kollman, Justin M., Andreas Merdes, Lionel Mourey, and David A. Agard. "Microtubule Nucleation by  $\gamma$ -Tubulin Complexes." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12, no. 11 (October 12, 2011): 709–21.
- Komarova, Yulia A., Anna S. Akhmanova, Shin-ichiro Kojima, Niels Galjart, and Gary G. Borisy. "Cytoplasmic Linker Proteins Promote Microtubule Rescue in Vivo." *The Journal of Cell Biology* 159, no. 4 (2002): 589–599.
- Kortazar, D., G. Carranza, J. Bellido, J.C. Villegas, M.L. Fanarraga, and J.C. Zabala. "Native Tubulin-Folding Cofactor E Purified from Baculovirus-Infected Sf9 Cells Dissociates Tubulin Dimers." *Protein Expression and Purification* 49, no. 2 (October 2006): 196–202.
- Kortazar, D., M.L. Fanarraga, G. Carranza, J. Bellido, J.C. Villegas, J. Avila, and J.C. Zabala. "Role of Cofactors B (TBCB) and E (TBCE) in Tubulin Heterodimer Dissociation." *Experimental Cell Research* 313, no. 3 (February 2007): 425–36.
- Kronja, Iva, Anamarija Kruljac-Letunic, Maiwen Caudron-Herger, Peter Bieling, and Eric Karsenti. "XMAP215–EB1 Interaction Is Required for Proper Spindle Assembly and Chromosome Segregation in *Xenopus* Egg Extract." Edited by David G. Drubin. *Molecular Biology of the Cell* 20, no. 11 (June 2009): 2684–96.
- Kumar, Anil, Cristina Manatschal, Ankit Rai, Ilya Grigoriev, Miriam Steiner Degen, Rolf Jaussi, Ines Kretschmar, et al. "Short Linear Sequence Motif LxxPTPh Targets Diverse Proteins to Growing Microtubule Ends." *Structure* 25, no. 6 (June 2017): 924–932.e4.
- Lacroix, Benjamin, Juliette van Dijk, Nicholas D. Gold, Julien Guizetti, Gudrun Aldrian-Herrada, Krzysztof Rogowski, Daniel W. Gerlich, and Carsten Janke. "Tubulin Polyglutamylation Stimulates Spastin-Mediated Microtubule Severing." *The Journal of Cell Biology* 189, no. 6 (June 14, 2010): 945–54.
- Lawo, Steffen, Mikhail Bashkurov, Michael Mullin, Mariana Gomez Ferreria, Ralf Kittler, Bianca Habermann, Andrea Tagliaferro, et al. "HAUS, the 8-Subunit Human Augmin

- Complex, Regulates Centrosome and Spindle Integrity." *Current Biology* 19, no. 10 (May 2009): 816–26.
- Lazarus, Jacob E., Armen J. Moughamian, Mariko K. Tokito, and Erika L. F. Holzbaur. "Dynactin Subunit P150Glued Is a Neuron-Specific Anti-Catastrophe Factor." Edited by David Pellman. *PLoS Biology* 11, no. 7 (July 16, 2013): e1001611.
- Le Guellec, R, J Paris, A Couturier, C Roghi, and M Philippe. "Cloning by Differential Screening of a *Xenopus* cDNA That Encodes a Kinesin-Related Protein." *Molecular and Cellular Biology* 11, no. 6 (1991): 3395–3398.
- Le Guellec, R, J Paris, A Couturier, C Roghi, and M Philippe. "Cloning by Differential Screening of a *Xenopus* cDNA That Encodes a Kinesin-Related Protein." *Molecular and Cellular Biology* 11, no. 6 (June 1991): 3395–98.
- Lee, Kwanwoo, and Kunsoo Rhee. "PLK1 Phosphorylation of Pericentrin Initiates Centrosome Maturation at the Onset of Mitosis." *The Journal of Cell Biology* 195, no. 7 (2011): 1093–1101.
- Lee, Sang Hyun, Harry Sterling, Alma Burlingame, and Frank McCormick. "Tpr Directly Binds to Mad1 and Mad2 and Is Important for the Mad1–Mad2-Mediated Mitotic Spindle Checkpoint." *Genes & Development* 22, no. 21 (November 1, 2008): 2926–31.
- Levesque, Aime A., and Duane A. Compton. "The Chromokinesin Kid Is Necessary for Chromosome Arm Orientation and Oscillation, but Not Congression, on Mitotic Spindles." *The Journal of Cell Biology* 154, no. 6 (September 17, 2001): 1135–46.
- Lewis, Sally A., Mary E. Gilmartin, John L. Hall, and Nicholas J. Cowan. "Three Expressed Sequences within the Human  $\beta$ -Tubulin Multigene Family Each Define a Distinct Isozyme." *Journal of Molecular Biology* 182, no. 1 (1985): 11–20.
- Lewis, Sally A., Wei Gu, and Nicholas J. Cowan. "Free Intermingling of Mammalian  $\beta$ -Tubulin Isozymes among Functionally Distinct Microtubules." *Cell* 49, no. 4 (May 22, 1987): 539–48.
- Li, P., Banjade, S., Cheng, H.-C., Kim, S., Chen, B., Guo, L., Llaguno, M., Hollingsworth, J. V., King, D. S., Banani, S. F., Russo, P. S., Jiang, Q.-X., Nixon, B. T., and Rosen, M. K. (2012) Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins *Nature* 483, 336– 340 DOI: 10.1038/nature10879
- Li, Wenjing, Takashi Moriwaki, Tomomi Tani, Takashi Watanabe, Kozo Kaibuchi, and Gohta Goshima. "Reconstitution of Dynamic Microtubules with *Drosophila* XMAP215, EB1, and Sentin." *The Journal of Cell Biology* 199, no. 5 (2012): 849–862.
- Lince-Faria, Mariana, Stefano Maffini, Bernard Orr, Yun Ding, Cláudia Florindo, Claudio E. Sunkel, Álvaro Tavares, Jørgen Johansen, Kristen M. Johansen, and Helder Maiato. "Spatiotemporal Control of Mitosis by the Conserved Spindle Matrix Protein Megator." *The Journal of Cell Biology* 184, no. 5 (March 9, 2009): 647–57.
- Lince-Faria, Mariana, Stefano Maffini, Bernard Orr, Yun Ding, Cláudia Florindo, Claudio E. Sunkel, Álvaro Tavares, Jørgen Johansen, Kristen M. Johansen, and Helder Maiato. "Spatiotemporal Control of Mitosis by the Conserved Spindle Matrix Protein Megator." *The Journal of Cell Biology* 184, no. 5 (March 9, 2009): 647–57.
- Lopez-Fanarraga, Mónica, Jesus Avila, Alicia Guasch, Miquel Coll, and Juan Carlos Zabala. "Review: Postchaperonin Tubulin Folding Cofactors and Their Role in Microtubule Dynamics." *Journal of Structural Biology* 135, no. 2 (August 1, 2001): 219–29.
- Loughlin, Rose, Jeremy D. Wilbur, Francis J. McNally, François J. Nédélec, and Rebecca Heald. "Katanin Contributes to Interspecies Spindle Length Scaling in *Xenopus*." *Cell* 147, no. 6 (December 2011): 1397–1407.

- Lüders, Jens, Urvashi K. Patel, and Tim Stearns. "GCP-WD Is a  $\gamma$ -Tubulin Targeting Factor Required for Centrosomal and Chromatin-Mediated Microtubule Nucleation." *Nature Cell Biology* 8, no. 2 (February 2006): 137–47.
- Ludueña, Richard F., Asok Banerjee, and Israr A. Khan. "Tubulin Structure and Biochemistry." *Current Opinion in Cell Biology* 4, no. 1 (February 1, 1992): 53–57.
- Lundin, Victor F., Martin Srayko, Anthony A. Hyman, and Michel R. Leroux. "Efficient Chaperone-Mediated Tubulin Biogenesis Is Essential for Cell Division and Cell Migration in *C. Elegans*." *Developmental Biology* 313, no. 1 (January 2008): 320–34.
- Lundin, Victor F., Michel R. Leroux, and Peter C. Stirling. "Quality Control of Cytoskeletal Proteins and Human Disease." *Trends in Biochemical Sciences* 35, no. 5 (May 2010): 288–97.
- Lundin, Victor F., Michel R. Leroux, and Peter C. Stirling. "Quality Control of Cytoskeletal Proteins and Human Disease." *Trends in Biochemical Sciences* 35, no. 5 (May 2010): 288–97.
- Ma, Li, Ming-Ying Tsai, Shusheng Wang, Bingwen Lu, Rong Chen, John R. Yates Iii, Xueliang Zhu, and Yixian Zheng. "Requirement for Nudel and Dynein for Assembly of the Lamin B Spindle Matrix." *Nature Cell Biology* 11, no. 3 (March 2009): 247–56.
- Mahoney, Nicole M., Gohta Goshima, Adam D. Douglass, and Ronald D. Vale. "Making Microtubules and Mitotic Spindles in Cells without Functional Centrosomes." *Current Biology* 16, no. 6 (March 2006): 564–69.
- Maiato, Helder, Alexey Khodjakov, and Conly L. Rieder. "Drosophila CLASP Is Required for the Incorporation of Microtubule Subunits into Fluxing Kinetochore Fibres." *Nature Cell Biology* 7, no. 1 (January 2005): 42–47.
- Maiato, Helder, Conly L. Rieder, and Alexey Khodjakov. "Kinetochore-Driven Formation of Kinetochore Fibers Contributes to Spindle Assembly during Animal Mitosis." *The Journal of Cell Biology* 167, no. 5 (December 6, 2004): 831–40.
- Maiato, Helder, Elizabeth AL Fairley, Conly L. Rieder, Jason R. Swedlow, Claudio E. Sunkel, and William C. Earnshaw. "Human CLASP1 Is an Outer Kinetochore Component That Regulates Spindle Microtubule Dynamics." *Cell* 113, no. 7 (2003): 891–904.
- Mains, Paul E, KenneJth Kemphues, Suzanne A Sprunger, and W B Wood. "Mutations Affecting the Meiotic and Mitotic Divisions of ThEe Arly Caenorhabditis ElegansEmbryo," n.d., 13.
- Maney, Todd, Andrew W. Hunter, Mike Wagenbach, and Linda Wordeman. "Mitotic Centromere-Associated Kinesin Is Important for Anaphase Chromosome Segregation." *The Journal of Cell Biology* 142, no. 3 (1998): 787–801.
- Maney, Todd, Michael Wagenbach, and Linda Wordeman. "Molecular Dissection of the Microtubule Depolymerizing Activity of Mitotic Centromere-Associated Kinesin." *Journal of Biological Chemistry* 276, no. 37 (September 14, 2001): 34753–58.
- Manna, Tapas, Gabriele Grenningloh, Herbert P. Miller, and Leslie Wilson. "Stathmin Family Protein SCG10 Differentially Regulates the Plus and Minus End Dynamics of Microtubules at Steady State in Vitro: Implications for Its Role in Neurite Outgrowth." *Biochemistry* 46, no. 11 (March 1, 2007): 3543–52.
- Maresca, Thomas J., Aaron C. Groen, Jesse C. Gatlin, Ryoma Ohi, Timothy J. Mitchison, and Edward D. Salmon. "Spindle Assembly in the Absence of a RanGTP Gradient Requires Localized CPC Activity." *Current Biology* 19, no. 14 (July 2009): 1210–15.
- Martin, Natalia, Jean Jaubert, Pierre Gounon, Eduardo Salido, Georg Haase, Marek Szatanik, and Jean-Louis Guénet. "A Missense Mutation in Tbce Causes Progressive

- Motor Neuronopathy in Mice." *Nature Genetics* 32, no. 3 (October 21, 2002): 443–47.
- Mastrorarde, D. N. "Interpolar Spindle Microtubules in PTK Cells." *The Journal of Cell Biology* 123, no. 6 (December 1, 1993): 1475–89.
- Maurer, Sebastian P., Nicholas I. Cade, Gergő Bohner, Nils Gustafsson, Emmanuel Boutant, and Thomas Surrey. "EB1 Accelerates Two Conformational Transitions Important for Microtubule Maturation and Dynamics." *Current Biology* 24, no. 4 (February 2014): 372–84.
- Mayr, Monika I., Stefan Hümmer, Jenny Bormann, Tamara Grüner, Sarah Adio, Guenther Woehlke, and Thomas U. Mayer. "The Human Kinesin Kif18A Is a Motile Microtubule Depolymerase Essential for Chromosome Congression." *Current Biology* 17, no. 6 (March 2007): 488–98.
- Mazumdar, Manjari, Suma Sundareshan, and Tom Misteli. "Human Chromokinesin KIF4A Functions in Chromosome Condensation and Segregation." *The Journal of Cell Biology* 166, no. 5 (August 30, 2004): 613–20.
- McEwen, Bruce F., Amy B. Heagle, Grisel O. Cassels, Carolyn F. Buttle, and Conly L. Rieder. "Kinetochore Fiber Maturation in PtK1 Cells and Its Implications for the Mechanisms of Chromosome Congression and Anaphase Onset." *The Journal of Cell Biology* 137, no. 7 (1997): 1567–1580.
- Mchedlishvili, Nunu, Helen K. Matthews, Adam Corrigan, and Buzz Baum. "Two-Step Interphase Microtubule Disassembly Aids Spindle Morphogenesis." *BMC Biology* 16 (January 23, 2018).
- McIntosh, J. Richard, Ekaterina L. Grishchuk, and Robert R. West. "Chromosome-Microtubule Interactions During Mitosis." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 18, no. 1 (November 2002): 193–219.
- McKenney, Richard J, Walter Huynh, Ronald D Vale, and Minhajuddin Sirajuddin. "Tyrosination of  $\alpha$ -tubulin Controls the Initiation of Processive Dynein–Dynactin Motility." *The EMBO Journal* 35, no. 11 (June 2016): 1175–85.
- McNally, Francis J., and Ronald D. Vale. "Identification of Katanin, an ATPase That Severs and Disassembles Stable Microtubules." *Cell* 75, no. 3 (1993): 419–429.
- Merdes, Andreas, Kasra Ramyar, Janet D Vechio, and Don W Cleveland. "A Complex of NuMA and Cytoplasmic Dynein Is Essential for Mitotic Spindle Assembly." *Cell* 87, no. 3 (November 1, 1996): 447–58.
- Merdes, Andreas, Rebecca Heald, Kumiko Samejima, William C. Earnshaw, and Don W. Cleveland. "Formation of Spindle Poles by Dynein/Dynactin-Dependent Transport of Numa." *The Journal of Cell Biology* 149, no. 4 (May 15, 2000): 851–62.
- Metzger, Thomas, Vincent Gache, Mu Xu, Bruno Cadot, Eric S. Folker, Brian E. Richardson, Edgar R. Gomes, and Mary K. Baylies. "MAP and Kinesin-Dependent Nuclear Positioning Is Required for Skeletal Muscle Function." *Nature* 484, no. 7392 (March 18, 2012): 120–24.
- Meunier, Sylvain, and Isabelle Vernos. "K-Fibre Minus Ends Are Stabilized by a RanGTP-Dependent Mechanism Essential for Functional Spindle Assembly." *Nature Cell Biology* 13, no. 12 (November 13, 2011): 1406–14.
- Millan-Zambrano, G., and S. Chavez. "Nuclear Functions of Prefoldin." *Open Biology* 4, no. 7 (July 9, 2014): 140085–140085.
- Mitchison, T J, P Maddox, J Gaetz, A Groen, M Shirasu, A Desai, E D Salmon, and T M Kapoor. "Roles of Polymerization Dynamics, Opposed Motors, and a Tensile Element in Governing the Length of *Xenopus* Extract Meiotic Spindles." *Molecular Biology of the Cell* 16 (2005): 13.

- Mitchison, Tim, and Marc Kirschner. "Dynamic Instability of Microtubule Growth." *Nature* 312, no. 5991 (November 1984): 237–42.
- Miyake, Noriko, Ryoko Fukai, Chihiro Ohba, Takahiro Chihara, Masayuki Miura, Hiroshi Shimizu, Akiyoshi Kakita, et al. "Biallelic TBCD Mutations Cause Early-Onset Neurodegenerative Encephalopathy." *The American Journal of Human Genetics* 99, no. 4 (October 2016): 950–61.
- Monroy, Brigitte Y., Danielle L. Sawyer, Bryce E. Ackermann, Melissa M. Borden, Tracy C. Tan, and Kassandra M. Ori-McKenney. "Competition between Microtubule-Associated Proteins Directs Motor Transport." *Nature Communications* 9, no. 1 (December 2018).
- Montenegro Gouveia, Susana, Kris Leslie, Lukas C. Kapitein, Rubén M. Buey, Ilya Grigoriev, Michael Wagenbach, Ihor Smal, et al. "In Vitro Reconstitution of the Functional Interplay between MCAK and EB3 at Microtubule Plus Ends." *Current Biology* 20, no. 19 (October 12, 2010): 1717–22.
- Moritz, Michelle, Michael B. Braunfeld, Vincent Guénebaud, John Heuser, and David A. Agard. "Structure of the  $\gamma$ -Tubulin Ring Complex: A Template for Microtubule Nucleation." *Nature Cell Biology* 2, no. 6 (June 1, 2000): 365–70.
- Moutinho-Pereira, Sara, Nico Stuurman, Olga Afonso, Marten Hornsveld, Paulo Aguiar, Gohta Goshima, Ronald D. Vale, and Helder Maiato. "Genes Involved in Centrosome-Independent Mitotic Spindle Assembly in *Drosophila* S2 Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, no. 49 (2013): 19808–19813.
- Moutinho-Santos, Tatiana, Paula Sampaio, Isabel Amorim, Madalena Costa, and Claudio E Sunkel. "In Vivo Localisation of the Mitotic POLO Kinase Shows a Highly Dynamic Association with the Mitotic Apparatus during Early Embryogenesis in *Drosophila*." *Biology of the Cell* 91, no. 8 (November 1, 1999): 585–96.
- Mukherjee, Suranjana, J. Daniel Diaz Valencia, Shannon Stewman, Jeremy Metz, Sylvain Monnier, Uttama Rath, Ana B. Asenjo, et al. "Human Fidgetin Is a Microtubule Severing the Enzyme and Minus-End Depolymerase That Regulates Mitosis." *Cell Cycle* 11, no. 12 (2012): 2359–66.
- Müller, Hannah, David Schmidt, Sandra Steinbrink, Ekaterina Mirgorodskaya, Verena Lehmann, Karin Habermann, Felix Dreher, et al. "Proteomic and Functional Analysis of the Mitotic *Drosophila* Centrosome." *The EMBO Journal* 29, no. 19 (October 6, 2010): 3344–57.
- Musacchio, Andrea, and Edward D. Salmon. "The Spindle-Assembly Checkpoint in Space and Time." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, no. 5 (May 2007): 379–93.
- Nakaoka, Yuki, Akatsuki Kimura, Tomomi Tani, and Gohta Goshima. "Cytoplasmic Nucleation and Atypical Branching Nucleation Generate Endoplasmic Microtubules in *Physcomitrella Patens*." *The Plant Cell* 27, no. 1 (January 2015): 228–42.
- Nigg, Erich A. "Centrosome Duplication: Of Rules and Licenses." *Trends in Cell Biology* 17, no. 5 (May 2007): 215–21.
- Nithianantham, Stanley, Sinh Le, Elbert Seto, Weitao Jia, Julie Leary, Kevin D. Corbett, Jeffrey K. Moore, and Jawdat Al-Bassam. "Tubulin Cofactors and Arl2 Are Cage-like Chaperones That Regulate the Soluble A $\beta$ -Tubulin Pool for Microtubule Dynamics." *Elife* 4 (2015): e08811.
- Nogales, Eva, Michael Whittaker, Ronald A. Milligan, and Kenneth H. Downing. "High-Resolution Model of the Microtubule." *Cell* 96, no. 1 (January 1999): 79–88.
- Nogales, Eva, Sharon G. Wolf, and Kenneth H. Downing. "Structure of the A $\beta$  Tubulin Dimer by Electron Crystallography." *Nature* 391, no. 6663 (January 1, 1998): 199–203.

- North, Brian J, Brett L Marshall, Margie T Borra, John M Denu, and Eric Verdin. "The Human Sir2 Ortholog, SIRT2, Is an NAD<sup>+</sup>-Dependent Tubulin Deacetylase." *Molecular Cell* 11, no. 2 (February 2003): 437–44.
- Nouar, Rofiya, Gilles Breuzard, Sonia Bastonero, Svetlana Gorokhova, Pascale Barbier, François Devred, Hervé Kovacic, and Vincent Peyrot. "Direct Evidence for the Interaction of Stathmin along the Length and the plus End of Microtubules in Cells." *The FASEB Journal* 30, no. 9 (September 2016): 3202–15.
- Nousiainen, M., H. H. W. Sillje, G. Sauer, E. A. Nigg, and R. Korner. "Phosphoproteome Analysis of the Human Mitotic Spindle." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, no. 14 (April 4, 2006): 5391–96.
- Oguchi, Yusuke, Seiichi Uchimura, Takashi Ohki, Sergey V. Mikhailenko, and Shin'ichi Ishiwata. "The Bidirectional Depolymerizer MCAK Generates Force by Disassembling Both Microtubule Ends." *Nature Cell Biology* 13, no. 7 (May 22, 2011): 846–52.
- Paddy, Michael R, Harald Saumweber, David A Agard, and John W Sedat. "Time-Resolved, in Vivo Studies of Mitotic Spindle Formation and Nuclear Lamina Breakdown in *Drosophila* Early Embryos," n.d., 17.
- Pamula, Melissa C., Shih-Chieh Ti, and Tarun M. Kapoor. "The Structured Core of Human  $\beta$  Tubulin Confers Isoform-Specific Polymerization Properties." *The Journal of Cell Biology* 213, no. 4 (May 23, 2016): 425–33.
- Parvari, Ruti, Eli HersHKovitz, Nili Grossman, Rafael Gorodischer, Bart Loeys, Alexandra Zecic, Geert Mortier, et al. "Mutation of TBCE Causes Hypoparathyroidism–Retardation–Dysmorphism and Autosomal Recessive Kenny–Caffey Syndrome." *Nature Genetics* 32, no. 3 (October 21, 2002): 448–52.
- Peris, Leticia, Manuel Thery, Julien Fauré, Yasmina Saoudi, Laurence Lafanechère, John K. Chilton, Phillip Gordon-Weeks, et al. "Tubulin Tyrosination Is a Major Factor Affecting the Recruitment of CAP-Gly Proteins at Microtubule plus Ends." *The Journal of Cell Biology* 174, no. 6 (September 11, 2006): 839–49.
- Peris, Leticia, Michael Wagenbach, Laurence Lafanechère, Jacques Brocard, Ayana T. Moore, Frank Kozielski, Didier Job, Linda Wordeman, and Annie Andrieux. "Motor-Dependent Microtubule Disassembly Driven by Tubulin Tyrosination." *The Journal of Cell Biology* 185, no. 7 (June 29, 2009): 1159–66.
- Peset, Isabel, and Isabelle Vernos. "The TACC Proteins: TACC-Ling Microtubule Dynamics and Centrosome Function." *Trends in Cell Biology* 18, no. 8 (August 2008): 379–88.
- Petry, S., C. Pugieux, F. J. Nedelec, and R. D. Vale. "Augmin Promotes Meiotic Spindle Formation and Bipolarity in *Xenopus* Egg Extracts." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, no. 35 (August 30, 2011): 14473–78.
- Petry, Sabine, Aaron C. Groen, Keisuke Ishihara, Timothy J. Mitchison, and Ronald D. Vale. "Branching Microtubule Nucleation in *Xenopus* Egg Extracts Mediated by Augmin and TPX2." *Cell* 152, no. 4 (February 2013): 768–77.
- Petry, Sabine. "Mechanisms of Mitotic Spindle Assembly." *Annual Review of Biochemistry* 85, no. 1 (June 2, 2016): 659–83.
- Portran, Didier, Laura Schaedel, Zhenjie Xu, Manuel Théry, and Maxence V. Nachury. "Tubulin Acetylation Protects Long-Lived Microtubules against Mechanical Ageing." *Nature Cell Biology* 19, no. 4 (April 2017): 391–98.
- Price, Helen P., Adam Peltan, Meg Stark, and Deborah F. Smith. "The Small GTPase ARL2 Is Required for Cytokinesis in *Trypanosoma Brucei*." *Molecular and Biochemical Parasitology* 173, no. 2 (October 2010): 123–31.

- Prota, Andrea E., Maria M. Magiera, Marijn Kuijpers, Katja Bargsten, Daniel Frey, Mara Wieser, Rolf Jaussi, et al. "Structural Basis of Tubulin Tyrosination by Tubulin Tyrosine Ligase." *The Journal of Cell Biology* 200, no. 3 (February 4, 2013): 259–70.
- Qi, Hongying, Uttama Rath, Dong Wang, Ying-Zhi Xu, Yun Ding, Weiguo Zhang, Melissa J. Blacketer, et al. "Megator, an Essential Coiled-Coil Protein That Localizes to the Putative Spindle Matrix during Mitosis in *Drosophila*." *Molecular Biology of the Cell* 15, no. 11 (2004): 4854–4865.
- Qi, Hongying, Uttama Rath, Yun Ding, Yun Ji, Melissa J. Blacketer, Jack Girton, Jørgen Johansen, and Kristen M. Johansen. "EAST Interacts with Megator and Localizes to the Putative Spindle Matrix during Mitosis In *Drosophila*." *Journal of Cellular Biochemistry* 95, no. 6 (August 15, 2005): 1284–91.
- Radcliffe, Pippa A., Dai Hirata, Leah Vardy, and Takashi Toda. "Functional Dissection and Hierarchy of Tubulin-Folding Cofactor Homologues in Fission Yeast." Edited by Tim Stearns. *Molecular Biology of the Cell* 10, no. 9 (September 1999): 2987–3001.
- Raff, Jordan W., Kim Jeffers, and Jun-yong Huang. "The Roles of Fzy/Cdc20 and Fzr/Cdh1 in Regulating the Destruction of Cyclin B in Space and Time." *The Journal of Cell Biology* 157, no. 7 (June 24, 2002): 1139–49.
- Rak, Kristen, Silke Frenz, Andreas Radeloff, Janos Groh, Sibylle Jablonka, Rudolf Martini, Rudolf Hagen, and Robert Mlynski. "Mutation of the TBCE Gene Causes Disturbance of Microtubules in the Auditory Nerve and Cochlear Outer Hair Cell Degeneration Accompanied by Progressive Hearing Loss in the Pmn/Pmn Mouse." *Experimental Neurology* 250 (December 2013): 333–40.
- Rath, U. , Wang, D. , Ding, Y. , Xu, Y. , Qi, H. , Blacketer, M. J., Girton, J. , Johansen, J. and Johansen, K. M. (2004), Chromator, a novel and essential chromodomain protein interacts directly with the putative spindle matrix protein skeletor. *J. Cell. Biochem.*, 93: 1033-1047.
- Ribbeck, Katharina, Tim Raemaekers, Geert Carmeliet, and Iain W. Mattaj. "A Role for NuSAP in Linking Microtubules to Mitotic Chromosomes." *Current Biology* 17, no. 3 (February 6, 2007): 230–36.
- Rogers, Gregory C., Nasser M. Rusan, Mark Peifer, and Stephen L. Rogers. "A Multicomponent Assembly Pathway Contributes to the Formation of Acentrosomal Microtubule Arrays in Interphase *Drosophila* Cells." Edited by Tim Stearns. *Molecular Biology of the Cell* 19, no. 7 (July 2008): 3163–78.
- Rogowski, Krzysztof, Juliette van Dijk, Maria M. Magiera, Christophe Bosc, Jean-Christophe Deloulme, Anouk Bosson, Leticia Peris, et al. "A Family of Protein-Deglutamylating Enzymes Associated with Neurodegeneration." *Cell* 143, no. 4 (November 2010): 564–78.
- Roll-Mecak, Antonina, and Francis J McNally. "Microtubule-Severing Enzymes." *Cell Structure and Dynamics* 22, no. 1 (February 1, 2010): 96–103.
- Roostalu, Johanna, and Thomas Surrey. "Microtubule Nucleation: Beyond the Template." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18 (August 23, 2017): 702.
- Sampaio, Paula, Elena Rebollo, Hanne Varmark, Claudio E. Sunkel, and Cayetano González. "Organized Microtubule Arrays in  $\gamma$ -Tubulin-Depleted *Drosophila* Spermatocytes." *Current Biology* 11, no. 22 (November 2001): 1788–93.
- Santaguida, Stefano, and Andrea Musacchio. "The Life and Miracles of Kinetochores." *The EMBO Journal* 28, no. 17 (September 2, 2009): 2511–31.
- Savoian, M. S., and D. M. Glover. "*Drosophila* Klp67A Binds Prophase Kinetochores to Subsequently Regulate Congression and Spindle Length." *Journal of Cell Science* 123, no. 5 (March 1, 2010): 767–76.

- Sawin, Kenneth E., Katherine LeGuellec, Michel Philippe, and Timothy J. Mitchison. "Mitotic Spindle Organization by a Plus-End-Directed Microtubule Motor." *Nature* 359, no. 6395 (October 1992): 540–43.
- Sawin, Kenneth E., Katherine LeGuellec, Michel Philippe, and Timothy J. Mitchison. "Mitotic Spindle Organization by a Plus-End-Directed Microtubule Motor." *Nature* 359, no. 6395 (October 1992): 540–43.
- Schaefer, M. K. E., H. Schmalbruch, E. Buhler, C. Lopez, N. Martin, J.-L. Guenet, and G. Haase. "Progressive Motor Neuronopathy: A Critical Role of the Tubulin Chaperone TBCE in Axonal Tubulin Routing from the Golgi Apparatus." *Journal of Neuroscience* 27, no. 33 (August 15, 2007): 8779–89.
- Schäfer, Michael K., Sarah Bellouze, Arnaud Jacquier, Sébastien Schaller, Laurence Richard, Stéphane Mathis, Jean-Michel Vallat, and Georg Haase. "Sensory Neuropathy in Progressive Motor Neuronopathy (*Pmn*) Mice Is Associated with Defects in Microtubule Polymerization and Axonal Transport: Sensory Neuropathy in *Pmn*." *Brain Pathology* 27, no. 4 (July 2017): 459–71.
- Schatz, Christoph A., Rachel Santarella, Andreas Hoenger, Eric Karsenti, Iain W. Mattaj, Oliver J. Gruss, and Rafael E. Carazo-Salas. "Importin  $\alpha$ -Regulated Nucleation of Microtubules by TPX2." *The EMBO Journal* 22, no. 9 (2003): 2060–2070.
- Schmidt, Hermann Broder, and Dirk Görlich. "Nup98 FG Domains from Diverse Species Spontaneously Phase-Separate into Particles with Nuclear Pore-like Permeability." Edited by Karsten Weis. *ELife* 4 (January 6, 2015): e04251.
- Schweizer, Nina, Cristina Ferrás, David M. Kern, Elsa Logarinho, Iain M. Cheeseman, and Helder Maiato. "Spindle Assembly Checkpoint Robustness Requires Tpr-Mediated Regulation of Mad1/Mad2 Proteostasis." *The Journal of Cell Biology* 203, no. 6 (December 23, 2013): 883–93.
- Schweizer, Nina, Nisha Pawar, Matthias Weiss, and Helder Maiato. "An Organelle-Exclusion Envelope Assists Mitosis and Underlies Distinct Molecular Crowding in the Spindle Region." *The Journal of Cell Biology* 210, no. 5 (August 31, 2015): 695–704.
- Scrofani, Jacopo, Teresa Sardon, Sylvain Meunier, and Isabelle Vernos. "Microtubule Nucleation in Mitosis by a RanGTP-Dependent Protein Complex." *Current Biology* 25, no. 2 (January 19, 2015): 131–40.
- Serna, M., G. Carranza, J. Martin-Benito, R. Janowski, A. Canals, M. Coll, J. C. Zabala, and J. M. Valpuesta. "The Structure of the Complex between  $\gamma$ -Tubulin, TBCE and TBCB Reveals a Tubulin Dimer Dissociation Mechanism." *Journal of Cell Science* 128, no. 9 (May 1, 2015): 1824–34.
- Sferra, Antonella, Gilbert Baillat, Teresa Rizza, Sabina Barresi, Elisabetta Flex, Giorgio Tasca, Adele D'Amico, et al. "TBCE Mutations Cause Early-Onset Progressive Encephalopathy with Distal Spinal Muscular Atrophy." *The American Journal of Human Genetics* 99, no. 4 (October 2016): 974–83.
- Sharma, Neeraj, Jessica Bryant, Dorota Wloga, Rachel Donaldson, Richard C. Davis, Maria Jerka-Dziadosz, and Jacek Gaertig. "Katanin Regulates Dynamics of Microtubules and Biogenesis of Motile Cilia." *The Journal of Cell Biology* 178, no. 6 (September 10, 2007): 1065–79.
- Sharp, David J., Gregory C. Rogers, and Jonathan M. Scholey. "Cytoplasmic Dynein Is Required for Poleward Chromosome Movement during Mitosis in *Drosophila* Embryos." *Nature Cell Biology* 2, no. 12 (December 2000): 922–30.

- Sharp, David J., Kristina R. Yu, John C. Sisson, William Sullivan, and Jonathan M. Scholey. "Antagonistic Microtubule-Sliding Motors Position Mitotic Centrosomes in *Drosophila* Early Embryos." *Nature Cell Biology* 1, no. 1 (May 1, 1999): 51–54.
- Shin, Yongdae, and Clifford P. Brangwynne. "Liquid Phase Condensation in Cell Physiology and Disease." *Science* 357, no. 6357 (September 22, 2017): eaaf4382.
- Silverman-Gavrila, Rosalind V., and Andrew Wilde. "Ran Is Required before Metaphase for Spindle Assembly and Chromosome Alignment and after Metaphase for Chromosome Segregation and Spindle Midbody Organization." *Molecular Biology of the Cell* 17, no. 4 (April 1, 2006): 2069–80.
- Sirajuddin, Minhajuddin, Luke M. Rice, and Ronald D. Vale. "Regulation of Microtubule Motors by Tubulin Isoforms and Post-Translational Modifications." *Nature Cell Biology* 16, no. 4 (April 2014): 335–44.
- Sironi, L. , Solon, J. , Conrad, C. , Mayer, T. U., Brunner, D. and Ellenberg, J. (2011), Automatic quantification of microtubule dynamics enables RNAi-screening of new mitotic spindle regulators. *Cytoskeleton*, 68: 266-278.
- Slep, Kevin C. "Structural and Mechanistic Insights into Microtubule End-Binding Proteins." *Current Opinion in Cell Biology* 22, no. 1 (February 2010): 88–95.
- Slep, Kevin C., and Ronald D. Vale. "Structural Basis of Microtubule Plus End Tracking by XMAP215, CLIP-170, and EB1." *Molecular Cell* 27, no. 6 (September 2007): 976–91.
- Sonnen, Katharina F., Lothar Schermelleh, Heinrich Leonhardt, and Erich A. Nigg. "3D-Structured Illumination Microscopy Provides Novel Insight into Architecture of Human Centrosomes." *Biology Open* 1, no. 10 (October 15, 2012): 965–76.
- Sorokin, AV, Kim, ER, Ovchinnikov, LP. « Nucleocytoplasmic transport of proteins ». *Biochemistry* (2007) Dec;72(13):1439-57.
- Stearns, T, M A Hoyt, and D Botstein. "Yeast Mutants Sensitive to Antimicrotubule Drugs Define Three Genes That Affect Microtubule Function." *Genetics* 124, no. 2 (1990): 251–262.
- Steinmetz, Michel O. "Structure and Thermodynamics of the Tubulin–Stathmin Interaction." *Journal of Structural Biology* 158, no. 2 (May 2007): 137–47.
- Steinmetz, Michel O., and Anna Akhmanova. "Capturing Protein Tails by CAP-Gly Domains." *Trends in Biochemical Sciences* 33, no. 11 (November 2008): 535–45.
- Strome, Susan, James Powers, Melanie Dunn, Kimberly Reese, Christian J Malone, John White, Geraldine Seydoux, and William Saxton. "Spindle Dynamics and the Role of  $\alpha$ -Tubulin in Early *Caenorhabditis Elegans* Embryos." *Molecular Biology of the Cell* 11 (2001): 14.
- Strunov, Anton, Lidiya V. Boldyreva, Evgeniya N. Andreyeva, Gera A. Pavlova, Julia V. Popova, Alena V. Razuvaeva, Alina F. Anders, et al. "Ultrastructural Analysis of Mitotic *Drosophila* S2 Cells Identifies Distinctive Microtubule and Intracellular Membrane Behaviors." *BMC Biology* 16, no. 1 (December 2018): 68.
- Subramanian, Radhika, Shih-Chieh Ti, Lei Tan, Seth A. Darst, and Tarun M. Kapoor. "Marking and Measuring Single Microtubules by PRC1 and Kinesin-4." *Cell* 154, no. 2 (July 2013): 377–90.
- Sui, Haixin, and Kenneth H. Downing. "Structural Basis of Interprotofilament Interaction and Lateral Deformation of Microtubules." *Structure* 18, no. 8 (August 2010): 1022–31.
- Sung, Hsin-Ho, Ivo A. Telley, Piyi Papadaki, Anne Ephrussi, Thomas Surrey, and Pernille Rørth. "*Drosophila* Ensconsin Promotes Productive Recruitment of Kinesin-1 to Microtubules." *Developmental Cell* 15, no. 6 (December 2008): 866–76.

- Szymanski, Dan. "Tubulin Folding Cofactors: Half a Dozen for a Dimer." *Current Biology* 12, no. 22 (November 19, 2002): R767–69.
- Tanenbaum, Marvin E, Libor Macůrek, Niels Galjart, and René H Medema. "Dynein, Lis1 and CLIP-170 Counteract Eg5-Dependent Centrosome Separation during Bipolar Spindle Assembly." *The EMBO Journal* 27, no. 24 (December 17, 2008): 3235–45.
- Tanenbaum, Marvin E., Libor Macůrek, Aniek Janssen, Erica F. Geers, Mónica Alvarez-Fernández, and René H. Medema. "Kif15 Cooperates with Eg5 to Promote Bipolar Spindle Assembly." *Current Biology* 19, no. 20 (November 2009): 1703–11.
- Tao, Li, Alex Mogilner, Gul Civelekoglu-Scholey, Roy Wollman, James Evans, Henning Stahlberg, and Jonathan M. Scholey. "A Homotetrameric Kinesin-5, KLP61F, Bundles Microtubules and Antagonizes Ncd in Motility Assays." *Current Biology* 16, no. 23 (December 2006): 2293–2302.
- Tao, Li, Alex Mogilner, Gul Civelekoglu-Scholey, Roy Wollman, James Evans, Henning Stahlberg, and Jonathan M. Scholey. "A Homotetrameric Kinesin-5, KLP61F, Bundles Microtubules and Antagonizes Ncd in Motility Assays." *Current Biology* 16, no. 23 (December 2006): 2293–2302.
- Thawani, Akanksha, Rachel S. Kadzik, and Sabine Petry. "XMAP215 Is a Microtubule Nucleation Factor That Functions Synergistically with the  $\gamma$ -Tubulin Ring Complex." *Nature Cell Biology* 20, no. 5 (May 2018): 575–85.
- Ti, Shih-Chieh, Gregory M. Alushin, and Tarun M. Kapoor. "Human  $\beta$ -Tubulin Isoforms Can Regulate Microtubule Protofilament Number and Stability." *Developmental Cell* 47, no. 2 (October 2018): 175–190.e5.
- Tian, Guoling, and Nicholas J. Cowan. "Tubulin-Specific Chaperones." In *Methods in Cell Biology*, 115:155–71. Elsevier, 2013.
- Tian, Guoling, Arunashree Bhamidipati, Nicholas J. Cowan, and Sally A. Lewis. "Tubulin Folding Cofactors as GTPase-Activating Proteins GTP HYDROLYSIS AND THE ASSEMBLY OF THE  $\alpha/\beta$ -TUBULIN HETERODIMER." *Journal of Biological Chemistry* 274, no. 34 (1999): 24054–24058.
- Tian, Guoling, Irina E. Vainberg, William D. Tap, Sally A. Lewis, and Nicholas J. Cowan. "Specificity in Chaperonin-Mediated Protein Folding." *Nature* 375, no. 6528 (May 1995): 250–53.
- Tian, Guoling, Melissa C. Huang, Ruti Parvari, George A. Diaz, and Nicholas J. Cowan. "Cryptic Out-of-Frame Translational Initiation of TBCE Rescues Tubulin Formation in Compound Heterozygous HRD." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, no. 36 (2006): 13491–13496.
- Tian, Guoling, Sally A. Lewis, Becket Feierbach, Timothy Stearns, Heidi Rommelaere, Christophe Ampe, and Nicholas J. Cowan. "Tubulin Subunits Exist in an Activated Conformational State Generated and Maintained by Protein Cofactors." *The Journal of Cell Biology* 138, no. 4 (1997): 821–832.
- Tian, Guoling, Yi Huang, Heidi Rommelaere, Joel Vandekerckhove, Christophe Ampe, and Nicholas J. Cowan. "Pathway Leading to Correctly Folded  $\beta$ -Tubulin." *Cell* 86, no. 2 (1996): 287–296.
- Torosantucci, Liliana, Maria De Luca, Giulia Guarguaglini, Patrizia Lavia, and Francesca Degraassi. "Localized RanGTP Accumulation Promotes Microtubule Nucleation at Kinetochores in Somatic Mammalian Cells." *Molecular Biology of the Cell* 19, no. 5 (2008): 1873–1882.
- Torres, Jorge Z., Matthew K. Summers, David Peterson, Matthew J. Brauer, James Lee, Silvia Senese, Ankur A. Gholkar, et al. "The STARD9/Kif16a Kinesin Associates with

- Mitotic Microtubules and Regulates Spindle Pole Assembly." *Cell* 147, no. 6 (December 2011): 1309–23.
- Tournebize, Régis, Andrei Popov, Kazuhisa Kinoshita, Anthony J. Ashford, Sonja Rybina, Andrei Pozniakovsky, Thomas U. Mayer, Claire E. Walczak, Eric Karsenti, and Anthony A. Hyman. "Control of Microtubule Dynamics by the Antagonistic Activities of XMAP215 and XKCM1 in *Xenopus* Egg Extracts." *Nature Cell Biology* 2, no. 1 (2000): 13.
- Toya, Mika, Masahiro Terasawa, Kayo Nagata, Yumi Iida, and Asako Sugimoto. "A Kinase-Independent Role for Aurora A in the Assembly of Mitotic Spindle Microtubules in *Caenorhabditis Elegans* Embryos." *Nature Cell Biology* 13 (May 15, 2011): 708.
- Trieselmann, N. "Ran Modulates Spindle Assembly by Regulating a Subset of TPX2 and Kid Activities Including Aurora A Activation." *Journal of Cell Science* 116, no. 23 (December 1, 2003): 4791–98.
- Trieselmann, N. "Ran Modulates Spindle Assembly by Regulating a Subset of TPX2 and Kid Activities Including Aurora A Activation." *Journal of Cell Science* 116, no. 23 (December 1, 2003): 4791–98.
- Tsai, Ming-Ying, Shusheng Wang, Jill M. Heidinger, Dale K. Shumaker, Stephen A. Adam, Robert D. Goldman, and Yixian Zheng. "A Mitotic Lamin B Matrix Induced by RanGTP Required for Spindle Assembly." *Science* 311, no. 5769 (2006): 1887–1893.
- Tulu, U. Serdar, Carey Fagerstrom, Nick P. Ferenz, and Patricia Wadsworth. "Molecular Requirements for Kinetochore-Associated Microtubule Formation in Mammalian Cells." *Current Biology* 16, no. 5 (March 7, 2006): 536–41.
- Uehara, Ryota, Ryu-suke Nozawa, Akiko Tomioka, Sabine Petry, Ronald D. Vale, Chikashi Obuse, and Gohta Goshima. "The Augmin Complex Plays a Critical Role in Spindle Microtubule Generation for Mitotic Progression and Cytokinesis in Human Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, no. 17 (April 28, 2009): 6998–7003.
- Uteng, Marianne, Christian Hentrich, Kota Miura, Peter Bieling, and Thomas Surrey. "Poleward Transport of Eg5 by Dynein–Dynactin in *Xenopus Laevis* Egg Extract Spindles." *The Journal of Cell Biology* 182, no. 4 (August 25, 2008): 715–26.
- Vaart, Babet van der, Mariella A. M. Franker, Marijn Kuijpers, Shasha Hua, Benjamin P. Bouchet, Kai Jiang, Ilya Grigoriev, Casper C. Hoogenraad, and Anna Akhmanova. "Microtubule Plus-End Tracking Proteins SLAIN1/2 and Ch-TOG Promote Axonal Development." *Journal of Neuroscience* 32, no. 42 (2012): 14722–14728a.
- Vainberg, Irina E, Sally A Lewis, Heidi Rommelaere, Christophe Ampe, Joel Vandekerckhove, Hannah L Klein, and Nicholas J Cowan. "Prefoldin, a Chaperone That Delivers Unfolded Proteins to Cytosolic Chaperonin." *Cell* 93, no. 5 (May 29, 1998): 863–73.
- Vale, Ronald D. "Severing of Stable Microtubules by a Mitotically Activated Protein in *Xenopus* Egg Extracts." *Cell* 64, no. 4 (1991): 827–839.
- Valiron, Odile, Isabelle Arnal, Nicolas Caudron, and Didier Job. "GDP-Tubulin Incorporation into Growing Microtubules Modulates Polymer Stability." *Journal of Biological Chemistry* 285, no. 23 (June 4, 2010): 17507–13.
- Vallin, Josefine, and Julie Grantham. "The Role of the Molecular Chaperone CCT in Protein Folding and Mediation of Cytoskeleton-Associated Processes: Implications for Cancer Cell Biology." *Cell Stress and Chaperones*, December 1, 2018.
- Varga, Vladimir, Cecile Leduc, Volker Bormuth, Stefan Diez, and Jonathon Howard. "Kinesin-8 Motors Act Cooperatively to Mediate Length-Dependent Microtubule Depolymerization." *Cell* 138, no. 6 (September 2009): 1174–83.

- Varga, Vladimir, Jonne Helenius, Kozo Tanaka, Anthony A. Hyman, Tomoyuki U. Tanaka, and Jonathon Howard. "Yeast Kinesin-8 Depolymerizes Microtubules in a Length-Dependent Manner." *Nature Cell Biology* 8, no. 9 (September 2006): 957–62.
- Vemu, Annapurna, Ewa Szczesna, Elena A. Zehr, Jeffrey O. Spector, Nikolaus Grigorieff, Alexandra M. Deaconescu, and Antonina Roll-Mecak. "Severing Enzymes Amplify Microtubule Arrays through Lattice GTP-Tubulin Incorporation." *Science* 361, no. 6404 (August 24, 2018): eaau1504.
- Verhey, Kristen J., and Jennetta W. Hammond. "Traffic Control: Regulation of Kinesin Motors." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, no. 11 (November 2009): 765–77.
- Voter, W. A., and H. P. Erickson. "The Kinetics of Microtubule Assembly. Evidence for a Two-Stage Nucleation Mechanism." *Journal of Biological Chemistry* 259, no. 16 (August 25, 1984): 10430–38.
- Wade, Richard H, and Anthony A Hyman. "Microtubule Structure and Dynamics." *Current Opinion in Cell Biology* 9, no. 1 (January 1, 1997): 12–17.
- Walczak, Claire E., and Rebecca Heald. "Chapter Three - Mechanisms of Mitotic Spindle Assembly and Function." In *International Review of Cytology*, edited by Kwang W. Jeon, 265:111–58. Academic Press, 2008.
- Walczak, Claire E., Timothy J. Mitchison, and Arshad Desai. "XKCM1: A Xenopus Kinesin-Related Protein That Regulates Microtubule Dynamics during Mitotic Spindle Assembly." *Cell* 84, no. 1 (1996): 37–47.
- Walker, Diana L., Dong Wang, Ye Jin, Uttama Rath, Yanming Wang, Jørgen Johansen, and Kristen M. Johansen. "Skeletor, a Novel Chromosomal Protein That Redistributes during Mitosis Provides Evidence for the Formation of a Spindle Matrix." *The Journal of Cell Biology* 151, no. 7 (2000): 1401–1412.
- Walker, R. A. "Dynamic Instability of Individual Microtubules Analyzed by Video Light Microscopy: Rate Constants and Transition Frequencies." *The Journal of Cell Biology* 107, no. 4 (October 1, 1988): 1437–48.
- Walker, Richard A, Edward D Salmon, and Sharyn A Endow. "The Drosophila Claret Segregation Protein Is a Minus-End Directed Motor Molecule" 347 (1990): 3.
- Walker, Richard A., Edward D. Salmon, and Sharyn A. Endow. "The Drosophila Claret Segregation Protein Is a Minus-End Directed Motor Molecule." *Nature* 347, no. 6295 (October 1, 1990): 780–82.
- Wan, Xiaohu, Ryan P. O'Quinn, Heather L. Pierce, Ajit P. Joglekar, Walt E. Gall, Jennifer G. DeLuca, Christopher W. Carroll, et al. "Protein Architecture of the Human Kinetochore Microtubule Attachment Site." *Cell* 137, no. 4 (May 2009): 672–84.
- Wang, Chaofeng, Weiwei Liu, Guangda Wang, Jun Li, Li Dong, Libo Han, Qi Wang, et al. "KTN80 Confers Precision to Microtubule Severing by Specific Targeting of Katanin Complexes in Plant Cells." *The EMBO Journal* 36, no. 23 (December 1, 2017): 3435–47.
- Wang, Enxiu, Edward R. Ballister, and Michael A. Lampson. "Aurora B Dynamics at Centromeres Create a Diffusion-Based Phosphorylation Gradient." *The Journal of Cell Biology* 194, no. 4 (August 22, 2011): 539–49.
- Wang, Haifeng, Ingrid Brust-Mascher, Gul Civelekoglu-Scholey, and Jonathan M. Scholey. "Patronin Mediates a Switch from Kinesin-13-Dependent Poleward Flux to Anaphase B Spindle Elongation." *The Journal of Cell Biology* 203, no. 1 (October 14, 2013): 35–46.
- Wang, Wei, Jianqing Ding, Elizabeth Allen, Ping Zhu, Lan Zhang, Hannes Vogel, and Yanmin Yang. "Gigaxonin Interacts with Tubulin Folding Cofactor B and Controls Its

- Degradation through the Ubiquitin-Proteasome Pathway." *Current Biology* 15, no. 22 (November 2005): 2050–55.
- Wasser, M. "The Drosophila EAST Protein Associates with a Nuclear Remnant during Mitosis and Constrains Chromosome Mobility." *Journal of Cell Science* 116, no. 9 (May 1, 2003): 1733–43.
- Wasser, Martin, and William Chia. "The Drosophila EAST Protein Associates with a Nuclear Remnant during Mitosis and Constrains Chromosome Mobility." *Journal of Cell Science* 116, no. 9 (2003): 1733–1743.
- Webster, D. R. "Assembly and Turnover of Detyrosinated Tubulin in Vivo." *The Journal of Cell Biology* 105, no. 1 (July 1, 1987): 265–76.
- Weisenberg, R. C., and W. J. Deery. "Role of Nucleotide Hydrolysis in Microtubule Assembly." *Nature* 263, no. 5580 (October 1976): 792–93.
- Westermann, Stefan, and Klaus Weber. "Post-Translational Modifications Regulate Microtubule Function." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, no. 12 (December 2003): 938–48.
- Wieczorek, Michal, Susanne Bechstedt, Sami Chaaban, and Gary J. Brouhard. "Microtubule-Associated Proteins Control the Kinetics of Microtubule Nucleation." *Nature Cell Biology* 17 (June 22, 2015): 907.
- Willison, Keith R. "The Substrate Specificity of Eukaryotic Cytosolic Chaperonin CCT." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 373, no. 1749 (June 19, 2018): 20170192.
- Winkler, Franziska, Maheshwar Gummalla, Lutz Künneke, Zhiyi Lv, Annette Zippelius, Timo Aspelmeier, and Jörg Grosshans. "Fluctuation Analysis of Centrosomes Reveals a Cortical Function of Kinesin-1." *Biophysical Journal* 109, no. 5 (September 2015): 856–68.
- Wittmann, Torsten, Matthias Wilm, Eric Karsenti, and Isabelle Vernos. "Tpx2, a Novel *Xenopus* Map Involved in Spindle Pole Organization." *The Journal of Cell Biology* 149, no. 7 (June 26, 2000): 1405–18.
- Wollman, R., E.N. Cytrynbaum, J.T. Jones, T. Meyer, J.M. Scholey, and A. Mogilner. "Efficient Chromosome Capture Requires a Bias in the 'Search-and-Capture' Process during Mitotic-Spindle Assembly." *Current Biology* 15, no. 9 (May 2005): 828–32.
- Wong, Jim, and Guowei Fang. "HURP Controls Spindle Dynamics to Promote Proper Interkinetochore Tension and Efficient Kinetochore Capture." *The Journal of Cell Biology* 173, no. 6 (June 19, 2006): 879–91.
- Woodruff, J. B., O. Wueseke, V. Viscardi, J. Mahamid, S. D. Ochoa, J. Bunkborg, P. O. Widlund, et al. "Regulated Assembly of a Supramolecular Centrosome Scaffold in Vitro." *Science* 348, no. 6236 (May 15, 2015): 808–12.
- Woodruff, Jeffrey B. "Phase Separation of BuGZ Promotes Aurora A Activation and Spindle Assembly." *The Journal of Cell Biology* 217, no. 1 (2018): 09–10.
- Woodruff, Jeffrey B., Beatriz Ferreira Gomes, Per O. Widlund, Julia Mahamid, Alf Honigmann, and Anthony A. Hyman. "The Centrosome Is a Selective Condensate That Nucleates Microtubules by Concentrating Tubulin." *Cell* 169, no. 6 (June 1, 2017): 1066–1077.e10.
- Xia, Peng, Xing Liu, Bing Wu, Shuyuan Zhang, Xiaoyu Song, Phil Y. Yao, Jennifer Lippincott-Schwartz, and Xuebiao Yao. "Superresolution Imaging Reveals Structural Features of EB1 in Microtubule Plus-End Tracking." Edited by Yixian Zheng. *Molecular Biology of the Cell* 25, no. 25 (December 15, 2014): 4166–73.

- Yao, Changfu, Chao Wang, Yeran Li, Michael Zavortink, Vincent Archambault, Jack Girton, and Kristen M Johansen. "Evidence for a Role of Spindle Matrix Formation in Cell Cycle Progression by Antibody Perturbation," n.d., 23.
- Yao, Changfu, Uttama Rath, Helder Maiato, David Sharp, Jack Girton, Kristen M. Johansen, and Jørgen Johansen. "A Nuclear-Derived Proteinaceous Matrix Embeds the Microtubule Spindle Apparatus during Mitosis." *Molecular Biology of the Cell* 23, no. 18 (2012): 3532–3541.
- Yokota, Shin-ichi, Hideki Yanagi, Takashi Yura, and Hiroshi Kubota. "Cytosolic Chaperonin Is Up-Regulated during Cell Growth: PREFERENTIAL EXPRESSION AND BINDING TO TUBULIN AT G<sub>1</sub>/S TRANSITION THROUGH EARLY S PHASE." *Journal of Biological Chemistry* 274, no. 52 (December 24, 1999): 37070–78.
- Yokoyama, Hideki, Oliver J. Gruss, Sofia Rybina, Maiwen Caudron, Malgorzata Schelder, Matthias Wilm, Iain W. Mattaj, and Eric Karsenti. "Cdk11 Is a RanGTP-Dependent Microtubule Stabilization Factor That Regulates Spindle Assembly Rate." *The Journal of Cell Biology* 180, no. 5 (March 10, 2008): 867–75.
- Yu, Kai-Wei, Ning Zhong, Yu Xiao, and Zhen-Yu She. "Mechanisms of Kinesin-7 CENP-E in Kinetochore–Microtubule Capture and Chromosome Alignment during Cell Division." *Biology of the Cell* 111, no. 6 (June 2019): 143–60.
- Zanic, Marija, Per O. Widlund, Anthony A. Hyman, and Jonathon Howard. "Synergy between XMAP215 and EB1 Increases Microtubule Growth Rates to Physiological Levels." *Nature Cell Biology* 15, no. 6 (May 12, 2013): 688–93.
- Zhang, C, Hughes M, Clarke P "Ran Controls Microtubule Asters and Nuclear Assembly," *Journal of Cell Science* 112, 2453-2461 (1999).
- Zhang, Dong, Kyle D. Grode, Shannon F. Stewman, Juan Daniel Diaz-Valencia, Emily Liebling, Uttama Rath, Tania Riera, et al. "Drosophila Katanin Is a Microtubule Depolymerase That Regulates Cortical-Microtubule plus-End Interactions and Cell Migration." *Nature Cell Biology* 13 (March 6, 2011): 361.
- Zhang, Rui, Gregory M. Alushin, Alan Brown, and Eva Nogales. "Mechanistic Origin of Microtubule Dynamic Instability and Its Modulation by EB Proteins." *Cell* 162, no. 4 (August 2015): 849–59.



## Caractérisation du rôle de TBCE et MAP7 dans l'assemblage du fuseau mitotique

**Mots clés :** Microtubule, Fuseau mitotique, MAPs, TBCE, Ensconsine

### Résumé :

La ségrégation des chromosomes requiert l'assemblage d'une structure dynamique appelée le fuseau mitotique qui est composé de microtubules. De nombreuses protéines appelées MAPs (Microtubule associated proteins) interagissent directement avec les microtubules afin de réguler leurs assemblages et leurs dynamiques. L'équipe a précédemment identifié de nouveaux candidats essentiels à l'assemblage du fuseau mitotique chez la drosophile. Au cours de ma thèse j'ai travaillé sur deux de ces protéines.

Dans un premier temps, j'ai caractérisé la protéine dTBCE (Drosophila tubulin binding cofactor E) et son rôle dans la division cellulaire. Cette protéine fait partie d'un complexe nécessaire pour l'hétérodimérisation de la tubuline.

Nous avons montré que dTBCE est essentielle afin de concentrer la tubuline dans la région du fuseau après la rupture de l'enveloppe nucléaire, ce qui permet la polymérisation des microtubules autour des chromosomes dans les cellules souches du système nerveux central de la drosophile, les neuroblastes (Nbs).

J'ai également travaillé sur les différents domaines d'Ensconsine, une protéine essentielle qui contrôle la longueur du fuseau et la séparation des centrosomes dans les Nbs ainsi que le transport asymétrique dans les ovocytes de drosophile. Cette étude nous a permis de mettre en évidence une double régulation du recrutement de la kinésine-1 sur les microtubules.

## Characterization of TBCE and MAP7 in the mitotic spindle assembly

**Keywords :** Microtubule, Mitotic Spindle, MAPs, TBCE, Ensconsin

### Abstract :

Chromosomes segregation requires the assembly of a dynamic structure called the mitotic spindle which is composed of microtubules. Many proteins called MAPs (Microtubule associated proteins) interact directly with microtubules to regulate their assemblies and their dynamics. The team has previously identified new genes involved in the mitotic spindle assembly in Drosophila. During my PhD, I worked on two of these proteins.

At first, I characterized the dTBCE protein (Drosophila tubulin binding cofactor E). This protein is part of a complex necessary for the heterodimerization of tubulin.

We have shown that dTBCE is essential to concentrate tubulin in the spindle region after nuclear envelope breakdown, which favours microtubules polymerization around chromosomes in Neuroblast cells (Nbs).

I also worked on the different domains of Ensconsin, an essential protein that controls spindle length and centrosome separation in Nbs as well as asymmetric transport in Drosophila oocytes. This study allowed us to highlight a double regulation of kinesin-1 recruitment on microtubules.